

**Gentechnologische Herstellung Epstein-Barr viraler Proteine
für Diagnostik und Prävention**

vorgelegt von
Manfred Motz
aus Lindau am Bodensee
im Mai 1986

Gentechnologische Herstellung Epstein-Barr viraler Proteine für Diagnostik und Prävention

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Manfred Motz
aus Lindau am Bodensee
im Mai 1986

durchgeführt am
Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung Molekulare Virologie, Prof. Dr. Hans Wolf

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Schmieger

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Werner Lubitz

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. Hans Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 8. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen.....	7
Zusammenfassung.....	9
A. Einleitung.....	11
1. Die Herpesviren.....	11
2. Das Epstein-Barr Virus.....	13
3. Das EBV-Genom.....	14
4. EBV-assoziierte Krankheiten.....	18
4.1. Infektiöse Mononukleose.....	18
4.2. Burkitt's Lymphom.....	19
4.3. EBV-positives Nasopharynxkarzinom (NPC).....	20
4.4. EBV-korrelierte Lymphome in immundefizienten Personen.....	24
5. Aufgabenstellung.....	24
B. Material und Methoden.....	29
1. Biologisches Material.....	29
1.1. Bakterienstämme.....	29
1.2. Plasmide.....	29
1.3. Eukaryotische Zelllinien.....	32
1.4. Seren.....	32
2. DNA-Manipulationen.....	32
2.1. Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.2. Restriktionsenzym-Verdau.....	33
2.3. Gelelektrophorese von DNA.....	34
2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	34
2.5. DNA-Ligierung.....	35
2.6. Transformation von Bakterien und Selektion.....	36
2.7. Transformation von m13 Phagen-DNA.....	36

2.8.	Charakterisierung von rekombinanten Klonen.....	37
2.9.	m13 Phagen.....	38
3.	EBV-Antigen Nachweis in E.coli-Zellen.....	38
3.1.	Präparation und Markierung von Minizellen.....	38
3.2.	Induktion.....	39
3.3.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	39
3.4.	Western Blot.....	40
4.	Reinigung von Expressionsprodukten aus Bakterien.....	40
5.	ELISA.....	41
6.	Immunisierung.....	41
7.	Transfektionsexperimente.....	42
7.1.	3T3-Zellen.....	42
7.2.	CHO-Zellen.....	42
8.	Immunfluoreszenz.....	43
9.	Radioaktive Markierung von Zellproteinen.....	43
9.1.	Iodinierung.....	43
9.2.	[³⁵ S]-Methionin-Markierung von P3HR1-Zellen.....	44
9.3.	Hybrid-selektionierte in vitro Translation.....	44
9.4.	Immunpräzipitation.....	45
10.	DNA- und RNA-Nachweis.....	45
10.1.	Isolierung von DNA und RNA aus CHO-Zellen.....	45
10.2.	Southern Blot.....	46
10.3.	Northern Blot.....	46
10.4.	[³² P]-Markierung von DNA.....	47
10.5.	Hybridisierung von Southern Blots.....	47
10.6.	Hybridisierung von Northern Blots.....	48
11.	Computer-Programme.....	48
C.	Ergebnisse.....	49
1.	Expression diagnostisch relevanter EBV-Proteine in E.coli.....	49

1.1.	Frühes Antigen p138.....	49
1.1.1.	Lokalisation.....	49
1.1.2.	Expression eines p138-Segments in E. coli-Minizellen.....	51
1.1.3.	Expression großer p138-Segmente.....	53
1.1.4.	Vorhersage antigener Bereiche in der Primärstruktur von p138 aufgrund von Hydrophilizitäts- und Sekundärstrukturberechnung.....	57
1.1.5.	Überprüfung der Vorhersage von antigenen Bereichen.....	58
1.1.6.	Expression von p138-Fragmenten in pUC-Vektoren als p138::lacZ α Fusionsproteine.....	62
1.1.7.	Fusion der beiden p138-Immungene und Insertion eines Oligonukleotids.....	64
1.1.8.	Variabilität der Antikörperspezifität gegen die beiden p138 Epitope.....	69
1.1.9.	Versuche zur Reinigung des von pUCARG1140 kodierten Proteins.....	70
1.1.10.	Überprüfung des Expressionsprodukts von pUCARG1140.....	71
1.1.11.	Verwendung des Fusionsantigens von pUCARG1140 im ELISA.....	72
1.2.	Membranantigen gp250/350.....	74
1.2.1.	Lokalisation antigener Bereiche in gp250/350.....	74
1.2.2.	Konstruktion von Subklonen und Expression in pUR-Vektoren.....	75
1.2.3.	Expression der gp350/350 Segmente in pUC-Vektoren.....	78
1.2.4.	Versuche zur Stabilisierung der gp250/350-Segmente.....	80
1.2.5.	Reinigung des β -Gal::gp250/350-Fusionsproteins von pUCLP1.9 und Immunisierung von Kaninchen.....	82
1.3.	Viruskapsidantigen p150.....	85
1.3.1.	Expression der 150-Segmente in pUR-Vektoren.....	86
1.3.2.	Expression der 150-Segmente in pUC-Vektoren.....	89
1.3.3.	Reinigung des hauptantigenen Segments.....	89
1.4.	EBV-spezifisches nukleäres Antigen EBNA-1.....	90
1.4.1.	Expression von EBNA-1.....	90
1.5.	Frühes Antigen p54.....	94

1.5.1.	Expression von p54.....	94
2.	Expression von EBV-Proteinen in eukaryotischen Systemen.....	96
2.1.	Verwendung eines retroviralen Vektors und Transformation von 3T3-Zellen.....	98
2.2.	Expression der Membranproteine gp250/350 in CHO-Zellen.....	99
2.2.1.	Konstruktion des Expressionsvektors pMDIIGP.....	99
2.2.2.	Transfektion von CHO-Zellen.....	101
2.2.3.	Nachweis von gp250/350 in den dhfr ⁺ CHO-Zellen.....	104
2.2.4.	Nachweis von EBV-spezifischen DNA-Sequenzen und Transkripten in den gp250/350 ⁺ -Zellen.....	107
2.2.5.	Amplifizierung der gp250/350-Expression.....	110
2.3.	Sekretion von gp250/350 aus CHO-Zellen.....	111
2.3.1.	Konstruktion von pMDIIGPTR.....	111
2.3.2.	Transfektion von pMDIIGPTR.....	112
2.3.3.	Identifizierung des Expressionsprodukts.....	114
2.3.4.	Nachweis EBV-spezifischer Transkripte.....	116
2.3.5.	Amplifikation.....	117
D.	Diskussion.....	118
p138.....		120
gp250/350.....		125
p150.....		126
EBNA-1.....		127
p54.....		127
Expression in Eukaryontenzellen.....		131
Literatur.....		138
Eigene Veröffentlichungen.....		154
Danksagung.....		158
Lebenslauf.....		159

Verzeichnis der Abkürzungen

aa	Aminosäure
Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaar
Ci	Curie
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute
CHO	Ovarienzelllinie aus chinesischen Hamstern
Da	Dalton
DADT	Diallyltartardiamid
dhfr	Dihydrofolat-Reduktase Gen
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EA	frühes Antigen
EBNA	EBV-assoziiertes nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	DNA-Fragment des p138-Gens
GC-Gehalt	Guanosin/Cytosin-Gehalt
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HSV	Herpes Simplex Virus
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	1000 Basen oder Kilobasenpaare
lacZ	β -Galaktosidase Gen
lacZo	N-terminaler Bereich des β -Gal Gens
LYDMA	von Lymphozyten erkanntes Membran-Antigen

M	molar
MA	Membran-Antigen
min	Minute
mcs	multiple Klonierungsstelle
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NPC	Nasopharynx-Karzinom
nt	Nukleotid
O	lacZ-Operator
OD	optische Dichte
oligo-nt	Oligonukleotid
ORF	offener Leserahmen
PA	Polyacrylamid
PAGE	PA Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	NaCl/Na-Citrat Puffer
ssDNA	Einzelstrang-DNA
VCA	Virus-Kapsid-Antigen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
::	Fusion von DNA- oder Protein-Fragmenten

Zusammenfassung

Nach der Erstinfektion durch das Epstein-Barr Virus (EBV), einem Herpesvirus des Menschen, kann sich das Krankheitsbild einer Infektiösen Mononukleose ausbilden. Das Virus bleibt lebenslang im Körper nachweisbar; zusätzlich wird es noch mit zwei Tumorerkrankungen assoziiert, dem Burkitt's Lymphom und dem Nasopharynxkarzinom (NPC). Alle EBV-korrelierten Erkrankungen lassen sich aufgrund des Auftretens bzw. der Erhöhung von Antikörpern gegen spezifische Antigen-Klassen des Virus serologisch bestimmen. Bei den Tumorerkrankungen kann eine Titerbestimmung für Früherkennung in Massenuntersuchungen und zur Verlaufskontrolle benutzt werden. Typisch beim NPC ist das Auftauchen von IgA-Antikörpern gegen 'frühe' Proteine des Virus.

Für serologische Bestimmungen werden EBV-Antigene benötigt. Da aber kein permissives Zellsystem für eine einfache Produktion von viralen Proteinen existiert, wird die Antikörperbestimmung mit Immunfluoreszenz-Tests an EBV-infizierten Zellen und Auswertung unter dem Mikroskop durchgeführt. Diese Prozedur ist aufwendig, teuer und benötigt erfahrenes Personal.

Das Ziel dieser Arbeit war die gentechnologische Produktion von definierten, diagnostisch relevanten EBV-Antigenen, die in einem Maschinen-lesbaren Test (ELISA) eingesetzt werden können und somit eine wesentliche Erleichterung und Erhöhung der Sensitivität mit sich bringen sollten.

Ein weiteres Ziel war es, die Hauptkomponente des viralen Envelope (gp250/350) zu exprimieren, da dieses Antigen nach Immunisierung neutralisierende Antikörper induziert und somit ein Kandidat für eine EBV-Vakzine ist.

Von jeder EBV Antigen-Klasse ist mindestens ein Protein in E.coli exprimiert worden; dies sind: p138 und p54 als frühe Antigene; p150 als Kapsid-Antigen; EBNA-1, ein in latent EBV-Genom tragenden B-Lymphozyten exprimiertes nukleäres Antigen und gp250/350, ein Membran-Antigen.

P54 konnte als vollständiges Protein produziert werden, bei EBNA-1 zeigte sich, daß der C-terminale Teil des Proteins in der Bakterienzelle nach Expression stabil blieb. Beide zeigten eine sehr gute Reaktivität mit NPC-Patienten Serum.

Die Produktion von p138, p150 und gp250/350 erwies sich aufgrund der Protein-größen schwieriger, da die Bakterien große eukaryotische Proteine nur sehr

ineffizient produzieren und zudem noch toxische Effekte auftraten. Aus diesem Grund wurde ein neuentwickeltes Computer-Programm angewandt, das eine Vorhersage antigener Stellen durch Berechnung von Sekundär-Struktur und Hydrophilizitäts-Werten möglich macht. Da wenig Erfahrungen über die Aussagekraft dieser Vorhersagen vorlagen, wurden die kodierenden Regionen der drei großen Proteine subkloniert und nach Expression als β -Gal Fusionsproteine auf Reaktivität mit Patientenserum untersucht. In den meisten Fällen wurde eine Übereinstimmung von Computer-Vorhersage und experimentellem Befund gefunden, was die allgemein gültige Aussagekraft des Programms unterstreicht.

Aufgrund von Hintergrundreaktionen sind β -Gal Fusionsproteine nicht für ELISAs geeignet; deswegen wurden die Proteinsegmente auch als nicht-Fusionsproteine exprimiert. Bei allen drei Antigenen konnten stabile Segmente identifiziert werden. Im Falle von p138 erwies sich von zwei identifizierten immunogenen Regionen nur eine als stabil exprimierbar. Durch Fusion dieses Segments mit der zweiten immunogenen Region konnte ein autologes Fusionsprotein gewonnen werden, das die beiden haupt-immunogenen Bereiche von p138 enthält.

Erste ELISAs sowie die Austestung dieses Sets an Antigenen mit verschiedenen Seren (frische Infektion, abgelaufene Infektion, NPC) lassen den Schluß zu, daß die gentechnologisch produzierten Antigene in der Diagnostik einsetzbar sein werden.

Für eine eventuelle Verwendung als Vakzine wurden Konstrukte geschaffen, die eine Expression der beiden Hauptkomponenten des viralen Envelopes (gp250/350) in CHO-Zellen erlauben. Die neukonstruierten, eukaryotischen Expressionsvektoren besitzen neben Transkriptionssignalen für die Transkription des viralen Membranprotein-Gens ein Dihydrofolat Reduktase-Gen für positive Selektion in dhfr⁻ CHO-Zellen.

Bei den rekombinant produzierten Membran-Antigenen wird über die Hälfte der Molekulargewichte, wie bei den authentischen EBV-Proteinen, durch Glycosylierungen beigetragen.

Durch Entfernung der kodierenden Sequenz für die C-terminale Membran-Verankerung konnte eine Sekretion der Proteine in das Medium erreicht werden. Damit ist nun eine Amplifizierung der transfizierten Sequenzen und damit der Expressionsprodukte möglich geworden; außerdem kann die Aufreinigung aus dem Überstand wesentlich einfacher erfolgen.

A. Einleitung

1. Die Herpesviren

Zusammen mit anderen tier- und human-pathogenen Viren wird das Epstein-Barr Virus in die Familie der Herpesviren gestellt. Diese Viren besitzen als gemeinsame Merkmale einen einzelnen, linearen DNA-Strang von über 100.000 Basen-paaren, der in eine ikosaedrische Kapsidhülle gepackt ist. Dieses Kapsid besteht aus 162 Kapsomeren (150 Pentone an Kanten und Flächen; 12 Hexone an den Ecken) und mißt 100-200nm im Durchmesser. Umschlossen wird dieses Partikel noch zusätzlich von einer Lipidmembran, in die virale Proteine eingelagert sind. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Viren ist die Fähigkeit, nach einer erfolgreichen Erstinfektion lebenslang in ihrem Wirt persistieren zu können. Diese Persistenz ist trotz Anwesenheit neutralisierender Antikörper möglich, weil sich die Viren latent in spezifischen Wirtszellen halten und wieder reaktiviert werden können.

Herpesviren werden aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt (Roizman et al.,1981):

Die Alpha-Herpesviren infizieren meist ephitheliale Zellen der Haut und der Schleimhäute und verursachen vesikuläre Läsionen. Einer der bekanntesten und am häufigsten vorkommenden, humanpathogenen Vertreter dieser Gruppe, das Herpes simplex Virus (HSV) Typ 1, befällt vorwiegend den Mundbereich, in schweren Fällen auch die Augenregion. Herpes simplex Virus Typ 2 wird bei Infektionen im Genitalbereich gefunden; die Primärinfektion durch das Varicella Zoster Virus führt zum Krankheitsbild der Windpocken.

Nach erfolgreicher Infektion persistieren die Vertreter dieser Gruppe in Nervenzellen; bei Herpes simplex Typ 1 und 2 sind es die Ganglienzellen der sensiblen Nerven, die die ursprünglich infizierten Hautpartien innervieren. Während der oft periodisch auftretenden Rekurrenzen werden diese Partien dann wieder befallen. Bei Varizella Zoster ist die Folge der Reaktivierung das klinische Bild der Gürtelrose, die meist den Rumpfbereich segmental befällt.

Vertreter der Beta-Herpesviren (Cytomegalie-Viren) verursachen eine Vergrößerung der infizierten Zellen. Die Infektion mit dem humanen Cytomegalie-Virus

verläuft bei Erwachsenen meist subklinisch; bei Neugeborenen können Komplikationen auftreten. Infektionsablauf und Ort der Persistenz sind nicht geklärt. Bei immunsupprimierten Personen treten schwere Erkrankungen auf, wobei die verschiedensten Organe befallen sein können.

Die Gamma-Herpesviren schließlich sind durch ihre Spezifität für Lymphozyten gekennzeichnet, in denen sie sich vermehren und persistieren. Alle Mitglieder dieser Gruppe infizieren lymphoide Zellen *in vivo* und *in vitro*; sie sind spezifisch für B- oder T-Lymphozyten. Das Epstein-Barr Virus, der einzige human-spezifische Vertreter, infiziert vorwiegend latent B-Lymphozyten und bestimmte Epithelzellen. Andere, wie das Marek's disease Virus (MDV) von Hühnern, sowie Herpesvirus *ateles* und Herpesvirus *saimiri* von Neuwelt-Affen, infizieren T-Lymphozyten und ebenfalls bestimmte Zelltypen der epithelialen Reihe. Allen Viren dieser Gruppe ist gemeinsam, daß sie in natürlichen und experimentellen Wirten Lymphoproliferationen hervorrufen sowie B- bzw. T-Zellen immortalisieren können.

Bei der Infektion einer Zelle durch Herpesviren erfolgt nach einer Bindung viraler Proteine der Lipidhülle an Zellrezeptoren eine Fusion mit der Zellmembran. Durch das Cytoplasma wird das Kapsidpartikel in den Zellkern transportiert, wobei auch die virale DNA freigesetzt wird. Bei HSV1 enthält das Kapsid ein Protein, das nach dem Eindringen in die Zelle für eine Verstärkung der Synthese von 'immediate early' Schaltproteinen sorgt. Die Regulationsmechanismen für die Entscheidung, ob der lytische Weg eingeschlagen wird, oder die DNA latent persistiert, sind noch ungeklärt.

Typisch für Herpesviren ist der Ablauf der lytischen Infektion in einem geregelten, kaskadenartigen Proteinsynthese-Ablauf. Zuerst werden nur einige wenige Schalt- oder Regulationsproteine synthetisiert. Laut Definition benötigen diese sogenannten alpha, primären oder 'immediate early' Proteine keine vorherige Synthese von anderen viralen Proteinen für ihre Transkription und Translation. Die Funktion dieser 'immediate early' Proteine ist das Abschalten der Wirtsproteinsynthese und das geregelte Anschalten der Produktion der beta, sekundären oder frühen Proteine, die hauptsächlich bei der Replikation der viralen DNA benötigt werden. Der letzte Schritt der Protein-Kaskade besteht in dem Anschalten der gamma, tertiären oder 'late' Proteine, zu denen die Strukturproteine des Virus-Kapsids sowie der Lipidhülle gehören.

Im Zellkern erfolgt anschließend das Verpacken des viralen Genoms in das Kapsid, welches dann durch die Kernmembran geschleust wird, in die vorher die Membranproteine der Lipidhülle eingelagert worden waren. Auf diese Weise

entstehen fertige Viruspartikel, die dann durch das endoplasmatische Retikulum nach außen transportiert werden.

2. Das Epstein-Barr Virus

1958 und in den frühen sechziger Jahren beschrieb D.Burkitt einen Tumor, der relativ häufig bei Kindern in bestimmten Regionen von Äquatorial-Afrika vorkommt (Burkitt, 1958). Außer in Neu-Guinea kommt dieses Burkitt Lymphom in anderen Regionen der Welt selten vor. Aufgrund der gleichen regionalen Verbreitung wie Infektionen mit dem Malaria-Erreger Plasmodium falciparum wurde zuerst an eine Übertragung des Tumor-verursachenden Agens durch Arthropoden gedacht und, daß die Malaria ein Kofaktor sein könnte (Burkitt, 1962). 1964 entdeckten Epstein, Achong und Barr, in Zellkulturen von Burkitt's Lymphom Biopsien Herpesviren (Epstein et al., 1964). Diese wurden dann von W. und G. Henle aufgrund immunologischer Untersuchungen als neuer Typ erkannt und Epstein-Barr Virus benannt. Serologische Studien in anderen Teilen der Welt ergaben, daß über 90% der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen dieses Virus besitzt. Nach Infektion mit diesem Virus kann das Krankheitsbild einer infektiösen Mononukleose entstehen, in vielen Fällen bleibt sie jedoch subklinisch (Henle et al., 1968). Daneben konnte eine sehr enge Assoziation zwischen dem Auftreten einer undifferenzierten Form des Nasopharynxkarzinoms und dem Vorhandensein von erhöhten Antikörper-Titern gegen EBV (de Schryver et al., 1969) sowie der Anwesenheit von EBV-DNA in den Tumorzellen hergestellt werden (Wolf et al., 1973; Desgranges et al., 1975; Andersson-Anvert et al., 1977).

Zelllinien von B-Lymphozyten aus Burkitt's Lymphom Biopsien produzieren in Kultur geringe Mengen an EBV, das in der Lage ist, andere B-Lymphozyten zu infizieren und zu transformieren (Pope et al., 1968). Aber es ist extrem schwierig und sehr aufwendig, größere Mengen an Viruspartikeln zu gewinnen, denn der Großteil der EBV-transformierten Zellen behält das Virus-Genom in einem latenten Zustand, nur jeweils ein bestimmter geringer Prozentsatz der Zellen geht in ein lytisches Stadium über und produziert Viruspartikel. Der Anteil von Zellen, die in ein lytisches Stadium übergehen, kann durch Tumorpromotoren wie Diterpenester oder Buttersäure gesteigert werden (zur Hausen und Bauer, 1983).

Eine häufig verwendete Linie ist die P3HRI-Linie, die durch Subklonierungen einer Burkitt's Lymphom Zelllinie, den Jijoye-Zellen, und Testung auf hohe

Virusproduktion erhalten wurde (Pulvertaft, 1964). Die Viruspartikel aus dieser Zelllinie haben die Fähigkeit verloren, B-Lymphozyten zu transformieren. Sie sind aber in der Lage, EBV-negative Zellen zu infizieren und werden besonders verwendet, um eine andere EBV-Genom tragende Zelllinie, Raji, zu infizieren (Pulvertaft, 1965). Raji-Zellen weisen die Besonderheit auf, daß bei den darin enthaltenen EBV Genomen ein für den lytischen Zyklus möglicherweise essentieller Teil deletiert ist, und sie demzufolge nur einige frühe EBV Proteine produzieren können (Kallin und Klein, 1983). Bei einer Superinfektion mit Viruspartikeln aus P3HR1 Zellen geht ein großer Prozentsatz dieser Zellen synchron in das lytische Stadium über. Das System eignet sich daher besonders gut für Regulationsuntersuchungen.

Eine weitere, häufig verwendete EBV-produzierende Zelllinie ist B95-8, die durch Transformation von Marmoset-Lymphozyten mit Virus aus B-Lymphozyten eines Mononukleose Patienten erhalten wurde (Miller et al., 1972). Die Viruspartikel von dieser Zelllinie können in vitro B-Lymphozyten transformieren. BamHI-Restriktionsfragmente dieses EBV-Genoms sind kloniert (siehe Abb.1; Skare und Strominger, 1980) und sequenziert (Baer et al., 1984) worden.

3. Das EBV-Genom

Die DNA besteht aus einem linearen Doppelstrang von über 160.000bp mit einem GC-Gehalt von 58%. Mehrere Repeat-Strukturen von ca. 500bp kommen an den Enden des Virusgenoms vor, das in der Zelle als kovalent geschlossener Ring vorliegt, aber auch -zumindest in einzelnen Fällen- in die zelluläre DNA integriert sein kann (Henderson et al., 1983; Matsuo et al., 1984). Neben den terminalen Repeat-Bereichen sind noch weitere über das gesamte Genom verteilt. Der größte ist der sogenannte BamHI-W Repeat, der aus ca. 3000bp langen Fragmenten besteht, deren Anzahl bei den unterschiedlichen Stämmen variiert, und die wiederum kleine Repeatstrukturen aufweisen (Baer et al., 1984).

Daneben gibt es noch eine Vielzahl kleinerer Bereiche mit Repeat-Strukturen, die ebenfalls von Stamm zu Stamm variieren können.

Verschiedene Isolate weisen unterschiedliche Deletionen, Insertionen und Restriktionsenzym-Spaltmuster auf. Die Heterogenität der DNA verschiedener Isolate scheint eine generelle Eigenschaft der Herpesviren zu sein, denn auch bei HSV und insbesondere bei Cytomegaloviren wurden sehr starke genomische Variationen gefunden (Hayward et al., 1984; Spear und Roizman, 1980). Bei den in Kultur gehaltenen Stämmen treten darüber hinaus noch zusätzlich Veränderungen auf, die einige spezifische Eigenschaften der Stämme bewirken. Der EBV-produzierende Stamm P3HR1, der, wie schon erwähnt, nicht mehr in der L-

ist, B-Lymphozyten zu transformieren, hat eine 6.5kbp-Deletion, die Teile des großen, internen BamHI-W Repeats sowie Bereiche rechts von diesem betrifft (Raab-Traub et al., 1978; Bornkamm et al., 1982), es gibt auch noch einige kleinere Deletionen in anderen Teilen des Genoms.

Daneben besitzen die P3HR1-Zellen noch defekte EBV-DNA Moleküle, die sogenannte het-DNA, die eventuell für die Fähigkeit der Viren verantwortlich ist, besonders gut in den lytischen Zyklus gehen zu können und diesen nach Superinfektion in Raji zu induzieren (Miller et al., 1984).

Raji-DNA hat eine große Deletion von 2.4kb am rechten Ende des Genoms in den BamHI-A und -N Fragmenten, sowie eine zweite von 3kb im mittleren Teil des Genoms. Aufgrund des Fehlens dieser Sequenzen scheint der lytische Zyklus in diesen Zellen nur bis zu einem frühen Stadium abzulaufen (Kallin und Klein, 1983).

Die B95-8 DNA schließlich besitzt eine 13kb große Deletion (Raab-Traub et al., 1980), die aber offenbar keinen größeren Einfluß auf Vermehrung und Transformation zu haben scheint.

Die Transkription der EBV-Genome in der Zelle muß in zwei Phasen unterteilt werden, Latenz und lytischer Zyklus. Während der Latenzphase werden nur einige wenige mRNAs transkribiert. Zwei Antigen-Klassen sind identifiziert worden, EBNA (EB-nukleäre Antigene; Reedman und Klein, 1973; Strnad et al., 1981) und LYDMA (lymphocyte detected membrane antigen; Svedmyr und Jondal, 1975). Ein Bestandteil von EBNA wird von einer 3.7kb-mRNA aus dem BamHI-K Fragment mit einem 2.0kb-Leseraster am 5'-Ende kodiert. Das Transkript entsteht aus einem splicing-Prozess, wobei die Akzeptor-Stelle vor dem Leseraster sitzt; die Herkunft des 3'-Exons sowie die Lokalisation des Promotors sind noch nicht bekannt (Heller et al., 1982; Hennessy et al., 1983a). Dieses EBNA-1 scheint bei der Replikation des Genoms eine Rolle zu spielen, denn Plasmide, die den Replikationsursprung des Virus tragen, können nur in permissiven Zelllinien gehalten werden, wenn sie zusätzlich noch das EBNA-1-kodierende DNA-Fragment enthalten. Das Protein scheint ein trans-wirkender Faktor für die zelluläre DNA-Polymerase zu sein, die im latenten Stadium für die Replikation des Genoms verantwortlich ist (Yates et al., 1985). Der Leserahmen für EBNA-1 enthält im N-terminalen Bereich kurze Repeat-Strukturen, deren Translation eine Abfolge von Glycin-Alanin ergibt. Da die Zahl der Repeats in den unterschiedlichen Zelllinien variiert, schwankt auch die Größe von EBNA-1 von 68kd bis 85kd (Strnad et al., 1981; Hennessy et al., 1983b).

Eine zweite mRNA wird vermutlich latent in infizierten Zellen von einem Leserahmen in den BamHI-Fragmenten W, Y, H transkribiert (EBNA-2), (Strnad et al.

1981, Hennessy et al, 1983b).

Eine weitere Region befindet sich im BamIII-N, wobei das Transkript durch Aussplicing von 2 Introns entsteht (Fennewald et al., 1984). Aufgrund der möglichen Sekundärstruktur des Proteins wurde vermutet, daß es sich dabei um ein Membranprotein handeln könnte, was dann auch mit Antisera gegen dieses Protein nachgewiesen wurde (Hennessy et al., 1984; Modrow und Wolf, 1986). Es handelt sich eventuell um das sogenannte "LYDMA", das bei der Kontrolle der latent infizierten B-Lymphozyten durch die zelluläre Immunabwehr eine Rolle spielen könnte.

Nach dem Umschalten in den lytischen Zyklus wird nahezu das gesamte Genom transkribiert. Wie bei Herpes simplex Typ 1 verläuft dieser in einem kaskadenartigen Prozeß, wobei zuerst nur die sogenannten 'immediate early' Proteine synthetisiert werden, von denen dann eines oder mehrere für das Anschalten der Synthese der frühen Proteine verantwortlich sind. Auf diese folgt dann in der späten Phase, nach Replikation der DNA, die Produktion der Strukturproteine von Viruskapsid und Membran.

Durch selektive Hemmung von Translation und Transkription zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei der Superinfektion mit P3HR1-Virus in Raji-Zellen konnten eine ganze Reihe von EBV-Proteinen den kinetischen Klassen zugeordnet werden (Bayliss und Wolf, 1981, 1982). Die kodierenden Regionen von einigen Proteinen wurden inzwischen ebenfalls aufgeklärt. Zu diesem Zweck wurde mRNA, isoliert aus EBV-produzierenden Zellen, selektiv an klonierte BamIII-Subfragmente des Virus hybridisiert und nach dem Ablösen *in vitro* translatiert (Hummel und Kieff, 1982; Cohen L.K. et al., 1984; Seibl und Wolf, 1985). Obwohl ein Vergleich mit Proteinen aus dem lytischen Zyklus aufgrund posttranslationaler Modifikationen eine genaue Korrelation nicht immer zuläßt, so können doch mit Hilfe der Sequenzdaten einer ganzen Reihe von Proteinen die exakten Leserahmen zugeordnet werden.

Serologisch werden aus historischen Gründen die EBV-Proteine in verschiedene Antigenklassen eingeteilt. Da die schwierige und ineffektive Vermehrung des Virus eine Großpräparation einzelner Proteine kaum zuläßt, werden die viralen Antigene und Antikörper dagegen mit EBV-produzierenden Zelllinien bestimmt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz an unfixierten und fixierten EBV-produzierenden Zellen lassen sich aufgrund der Lokalisation, der Verteilung und der Resistenz gegen Lösungsmittel folgende Antigenklassen unterscheiden:

EBNA (Epstein-Barr-nukleäres Antigen), das sich in allen infizierten Zellen

mit dem latent vorhandenen EBV-Genom nachweisen läßt.

Bei dem sogenannten EA ('early antigen') handelt es sich um verschiedene Proteine der frühen Phase, die aufgrund verschiedener Verteilung in der Zelle noch in EA-D ('diffuse') und EA-R ('restricted') eingeteilt werden können. Durch Hemmversuche und in vitro Translationen konnte eine Reihe von Proteinen als EA definiert werden, darunter ein Protein mit 54kDa im BamHI-M Fragment (EA-D), sowie ein Protein mit 138kDa aus dem BamHI-A Fragment (Seibl und Wolf, 1985).

Die Proteine des Viruskapsids werden als VCA (virus capsid antigen) bezeichnet. Ihre genauen Bestandteile sind noch nicht geklärt, aber zwei Proteine mit den jeweiligen ORFs konnten dieser Klasse zugeordnet werden. Es handelt sich um ein 143kDa großes Protein aus dem BamHI-C Fragment und ein Protein mit der Größe von 150kDa aus den BamHI-Fragmenten c und D.

Die MA-Proteine ('membrane antigen') sind auf dem Envelope und auf der Zytoplasmamembran von produzierenden Zellen lokalisiert. Der MA Komplex besteht wahrscheinlich aus vier Komponenten mit den Molekulargewichten von 350, 250, 140 und 85kDa. Das Protein mit 140kDa ist als einziges nicht glycosiliert (Qualtiere und Pearson, 1979, 1980; Thorley und Edson, 1979; Edson und Thorley-Lawson, 1981).

Die beiden größten Komponenten besitzen teilweise dieselben antigenen Epitope und kodieren beide im BamHI-L Fragment. Durch ein partielles 'splicing' der mRNA mit 3.2kb entsteht ein 2.5kb großes Transkript, das im selben Leseraster das 250kDa-Protein kodiert (Beisel et al., 1985). Mehr als die Hälfte der Molekulargewichte wird durch N- und O-glycosidisch gebundene Zucker verursacht (Hummel et al., 1984). Antikörper gegen diese Proteine sind Virus-neutralisierend (Hoffman et al., 1980; Thorley-Lawson und Geillinger, 1980) und sie können nach Immunisierung neutralisierende Antikörper induzieren und Schutz vor einer Virusinfektion vermitteln (North et al., 1982; Epstein et al., 1985).

4. EBV-assoziierte Krankheiten

4.1 Infektiöse Mononukleose

In westlichen Ländern kommt es meist im Alter von 15-25 Jahren zu einer Serokonversion nach einer Erstinfektion mit EBV, wobei ca. 50% der Infizierten (Niederman et al., 1970) nach einer Inkubationszeit von 30-50 Tagen klinische Symptome zeigen (infektiöse Mononukleose). Eine fast völlige Durchseuchung mit EBV wird dagegen schon bei Kleinkindern in Ländern der Dritten Welt beobachtet, wobei die Erstinfektion zu einem viel größeren Prozentsatz subklinisch verläuft als bei Kontakt in späterem Alter. Die infektiöse Mononukleose äußert sich in Lymphknotenschwellungen, Fieber, Unwohlsein, gelegentlich werden auch Vergrößerungen der Milz und eine Beeinträchtigung der Leberfunktionen beobachtet (Übersichtsartikel in Epstein und Achong, 1979).

Die primäre Eintrittspforte des Virus sind möglicherweise Lymphozyten oder noch unbekannte spezielle Zellen des Rachenraums. Von dort gelangt das Virus auf noch ungeklärten Wegen in Epithelzellen der Ohrspeicheldrüse (Wolf et al., 1984). Hier wird das Virus repliziert und infiziert B-Lymphozyten, die in der Regel keine Viren vermehren, aber im Körper in geringer Zahl (0.01% beim normal Seropositiven) nachweisbar sind. Nach einer Modellvorstellung (Wolf et al., 1986) wird mit einer gewissen Häufigkeit in diesen Lymphozyten das 'latente Membranantigen' (LYDMA) aktiviert, worauf sie durch anti-LYDMA T-Killerzellen eliminiert werden.

Bei akut Infizierten sind noch keine spezifischen T-Killerzellen (anti-LYDMA) zur frühzeitigen Eliminierung der aktivierten Zellen vorhanden, weswegen es zu einer großen Zahl EBV-positiver Zellen im Körper kommt. Diese können gelegentlich in einen voll lytischen Zyklus einmünden und Antigene und Viruspartikel für die Antikörperbildung und Neuinfektion von B-Lymphozyten im Blutstrom freisetzen.

Im Verlauf der Erstinfektion kommt es zu einer massiven Proliferation von B-Lymphozyten, da EBV als B-Zell Stimulator wirkt. Diese Zellen bewirken unter anderem eine Produktion von nicht EBV-kreuzreagierenden, heterophilen IgM-Antikörpern. Der Proliferation dieser B-Lymphozyten folgt eine Vermehrung von T-Lymphozyten, die als Suppressor-Zellen die Proliferation von B-Lymphozyten unterdrücken.

Im Serum erscheinen zuerst IgM-Antikörper gegen VCA und den EA-Komplex, die später von IgG-Antikörpern abgelöst werden.

Mit dem Auftauchen von T-Zellen gegen EBV-aktivierte B-Lymphozyten werden

diese Zellen schon frühzeitig erkannt (Anschalten der LYDMA-Synthese?) und eliminiert. Die Rate an latent EBV-tragenden B-Lymphozyten (0.01%) bei dem normal Seropositiven wird dann reguliert durch das Auffüllen des Bestandes durch Neuinfektion aus permanent produzierenden Zellen der Ohrspeicheldrüse und der Anschaltrate von LYDMA und darauf folgender Elimination durch T-Zelle. In den latent EBV-tragenden Zellen wird unter anderem EBNA-1 ständig transkribiert, daher findet man bei seropositiven Personen einen anti-EBNA-1 Titer, der eine Folge der Freisetzung dieses Proteins aus degradierten B-Lymphozyten ist.

4.2. Burkitt's Lymphom

In einigen Gegenden von Zentralafrika und Neu-Guinea ist dieser Tumor der Häufigste bei Kindern mit einer Inzidenz von bis zu 10 Fällen pro 100.000 pro Jahr. Diese Regionen sind in heißen feuchten Ebenen, wo die Malaria weit verbreitet ist. Benachbarte Gegenden ohne hohe Malaria-Durchseuchung zeigen auch eine niedrigere Inzidenz für das Burkitt's Lymphom. 98% der Tumorbiopsien aus diesen Hochrisikogegenden sind EBV-DNA positiv, wogegen Burkitt's Lymphome außerhalb dieser Areale nur zu 25% EBV-DNA positiv sind. Aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeitsverteilungen wird vermutet, daß die Inzidenz für ein EBV-negatives Burkitt's Lymphom weltweit gleich hoch sein dürfte, und daß für die Entstehung der EBV-DNA positiven Tumoren in den Hochrisikogegenden neben dem Virus noch andere Faktoren nötig sein müssen. Die gleiche Verteilung wie die holo-endemische Malaria läßt den Schluß zu, daß diese einer, aber nicht der einzige Faktor sein könnte.

Burkitt's Lymphome weisen regelmäßig chromosomale Abnormalitäten auf. Dabei wird ein Stück von Chromosom 8, das das Gen für c-myc trägt, auf Chromosom 14 (in 80% der Fälle) oder auf Chromosom 2 oder 22 transloziert. In allen Fällen wird dadurch das c-myc Gen in die Nähe von Transkriptions-Kontrollsequenzen für Immunglobulin Gene gebracht (Taub et al., 1982; Leder et al, 1983). Bis jetzt ist jedoch nicht geklärt, ob eine Überproduktion von c-myc für die Tumorentstehung verantwortlich ist, und welche Rolle EBV und andere Faktoren haben. Außerdem ist noch unklar, wie es den Burkitt's Lymphom-Zellen gelingt, der zellulären Immunabwehr zu entkommen. Eine Rolle dabei könnte LYDMA spielen, denn es ist gezeigt worden, daß in Burkitt's Lymphom-Zellen eine veränderte Expression eines Membranproteins (LYDMA ?) stattfindet. Möglicherweise können die Zellen in vivo deswegen nicht mehr von der Immunabwehr erkannt werden (Modrow und Wolf, 1986).

Es wurde gezeigt, daß Patienten mit Burkitt's Lymphom zuvor zwei Jahre lang hohe anti-EBV Titer aufwiesen. Besonders erhöht sind die anti-IgG/VCA-Antikörper und IgG Antikörper gegen die R-Komponente von EA. Ein hoher anti-E Titer bedeutet ein ca. 30-fach erhöhtes Risiko, dieses Lymphom zu bekommen. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich. Personen aufgrund anti-EBV Titer als hochrangig gefährdet für Burkitt's Lymphom einzuordnen und genauer zu überwachen. Bei einer frühzeitigen Entdeckung ist der Tumor relativ leicht chemotherapeutisch zu behandeln.

4.3. EBV-positives Nasopharynxkarzinom (NPC)

Weltweit ist dieser Tumor mit einer Inzidenz von über 0.3 pro 100.000 pro Jahr relativ selten. Es gibt jedoch in China und einigen anderen Regionen Bevölkerungsgruppen, die ein vielfach höheres Risiko für diesen Tumor zeigen. In den chinesischen Provinzen Guangxi und Guangdong ist das Nasopharynxkarzinom neben dem Leberkarzinom der häufigste Tumor des Menschen (Atlas of Cancer Mortality in the People's Republic of China; China Map Press, 1984). Ob es sich hierbei um genetische Prädisposition (HLA-Typ) oder Umwelteinflüsse handelt, ist noch nicht geklärt.

Der EBV-DNA-positive Tumor entsteht aus Epithelzellen des Nasopharynx und läßt sich morphologisch als nicht differenziert einordnen. Er wächst aggressiv und metastasiert in die benachbarten Lymphknoten. Im Gegensatz zum Burkitt's Lymphom lassen sich in NPC-Biopsien aus allen Teilen der Welt EBV-Genome nachweisen (Wolf et al., 1973).

Die malignen Zellen des NPC sind epitheloid. Trotz vieler Bemühungen ist es nicht geklärt, ob Rezeptoren für EBV auf diesen Zellen in biologisch signifikanter Menge vorhanden sind; neueste Befunde schließen dies nicht aus (Rickinson, 1984).

Es wurde versucht, das Vorhandensein der EBV-Genome mit einer veränderten Spezifität von einzelnen Viruspartikeln für Epithelzellen zu erklären, oder damit, daß zusätzliche EBV-Rezeptor positive Zellen vorhanden sind. Obwohl für diese Theorien einige experimentelle Daten vorliegen, gibt es noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Es ist bekannt, daß in Zellkultur EBV-Zelllinien nach Zugabe von Tumorpromotoren mit EBV-negativen Zellen fusionieren (Bayliss und Wolf, 1980). Bei diesen Substanzen, die zu einer teilweisen Aktivierung von EBV führen, handelt es sich um Substanzen wie kurzkettige Fettsäuren, die auch von Bakterien des Rachenraums (Fusobakterien) produziert werden, oder um die

Inhaltsstoffe einer ganzen Reihe von Pflanzen, die als Heil- und Nahrungsmittel in China verwendet werden. (Ito et al., 1981; Zeng et al., 1983). Im Nasen-Rachenraum stehen B-Lymphozyten und Epithelzellen in engem Kontakt zueinander und sind gleichzeitig den möglichen Einflüssen von aufgenommenen Aktivierungstoffen ausgesetzt. Diese Region bietet damit alle Voraussetzungen für den Übergang von EBV in epitheloide Zellen durch vollständige oder teilweise Zellfusion.

Patienten mit NPC haben deutlich erhöhte Titer gegen VCA, MA und EA der D-Komponente. Im Gegensatz zu Personen mit Infektiöser Mononukleose oder Burkitt's Lymphom besitzen diese neben IgG vor allem IgA-Antikörper, die möglicherweise aufgrund der Lokalisation des Primärtumors in den submucosalen Schichten des Nasopharynx nur bei NPC in so hohen Titern produziert werden. Diese Antikörpertiter können für eine Verlaufskontrolle bei der Therapie von NPC benutzt werden; sinkende Titer signalisieren eine gute Prognose und ein Verschwinden des Tumors. Bei Rezidiven steigt der Titer wieder an. Das heißt, daß eine einfache serologische Kontrolle der EBV-Antikörper den Status eines NPC und dessen Prognose anzeigt. Darüber hinaus zeigen Patienten lange vor Ausbruch und möglicher Entdeckung des Tumors einen erhöhten Titer insbesondere gegen VCA (Henle und Henle, 1970, 1976, 1979) und MA (Zhu et al., 1986). Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß ein Großteil von NPC durch serologische Kontrollen schon in den frühen Phasen I und II erkannt werden kann (91.4%). Diese frühen Tumorstadien sind noch relativ gut therapierbar, die 5 Jahres-Überlebensraten betragen hier 93.3% bzw. 74.7%, sie sinken drastisch in weiter fortgeschrittenen Stadien.

Tab.1 Zeitpunkt der NPC-Diagnose (Stadium I-IV) bei serologisch getesteten Personen im Vergleich zur Normalbevölkerung in NPC-Hochrisiko Gebieten von China (nach Zeng und de The, 1985).

		Stadium				total
		I	II	III	IV	
Normalbevölkerung	Fälle	18	312	556	180	1066
	%	1,7	29,8	51,3	17,2	100
serologisch getestete Personen	Fälle	15	17	3	0	35
	%	43,0	48,8	9,5	0	100
5-Jahres Überlebensraten	%	93,3	74,7	43,0	11,0	

Tab.2 NPC-Diagnose Raten bei IgA/VCA- und IgA/EA-positiven Personen in NPC-Hochrisiko Gebieten von China (nach Zeng et al., 1982; Zeng et al., 1985b)

Ort	getestete Personen	Antigen	Positive	NPC- Diagnosen	Entdeckungs- raten
Zangwu- Distrikt	148029	IgA/VCA	3533	87	2,4%
Wuzhou- Stadt	12930	IgA/VCA	640	13	1,9%
		IgA/EA	30	9	30%
Lanchang- Distrikt	26441	IgA/VCA	227	13	5,7%
		IgA/EA	14	6	43%
Zangwu- Distrikt boat people	518	IgA/VCA	20	2	10%
		IgA/EA	5	2	40%

In vielen Fällen wird bei serologisch nicht getesteten Patienten der Tumor erst in späteren Stadien erkannt, nachdem er schon metastasiert; die Überlebensraten sind entsprechend schlecht. Die Entdeckungsrate von NPC in den frühen Stadien I und II ist mit über 90% bei serologischer Kontrolle dreimal so hoch, die Rate im Stadium I sogar 25mal so hoch wie bei Patienten ohne serologische Vorsorgeuntersuchung. Diese Tatsache machte man sich zunutze, große Bevölkerungskollektive in den Hochrisikogebieten von China zu testen. Ca. 190.000 Personen wurden in der Zwischenzeit auf das Vorhandensein von anti-VCA Antikörpern getestet (Tab. 2). Die Entdeckungsrate von NPC in verschiedenen Studien bei den VCA-positiven lag zwischen 2% und 10%, was verglichen mit der jährlichen Inzidenzrate von 30-50 pro 100.000 im Schnitt eine Steigerung um ca. das 100-fache bedeutet (Zeng et al., 1982; Zeng et al., 1985b).

Die IgA/VCA-positiven Personen wurden als NPC-gefährdet eingestuft und weiter beobachtet. Eine Reihe von NPC-Fällen konnte so schon in frühen Stadien entdeckt werden, denn IgA/VCA-Titer sind bereits 10-41 Monate vor einem klinisch auffälligen Tumor zu finden (Zeng et al., 1985a).

Die Tatsache, daß in Hochrisiko-Gebieten 1-3% der erwachsenen Bevölkerung IgA/VCA Antikörper besitzen, macht es notwendig, zur Abklärung des Vorliegens eines Tumors weitere Tests mit höherer Spezifität durchzuführen.

Die Bestimmung von IgA/EA-Antikörpern (Tab.2) und IgA/MA-Titern (Zhu et al., 1986; Pi et al., 1986) hat sich hier bewährt.

Während die Entdeckungsrate von NPC unter den IgA/VCA positiven zwischen 2.7% und 10% beträgt, wurde bei 30 bis 43% der IgA/EA-positiven Personen dieser Tumor diagnostiziert (Tab.2); in einer Folgestudie wurde bei einer Reihe der klinisch gesunden Personen mit IgA/EA Antikörpern nach relativ kurzer Zeit ein Tumor klinisch manifest (Zeng et al., 1985a).

Für die NPC-Voruntersuchung hat dies folgende Konsequenz: IgA/VCA-positiv Personen werden als NPC-gefährdet eingestuft und in regelmäßigen Abständen auf das Vorhandensein oder den Anstieg von IgA/EA untersucht. Bei dem Auftret oder Erhöhung dieser Antikörper ist die Wahrscheinlichkeit einer NPC-Diagnose sehr erhöht, auch wenn sich der Tumor noch nicht in einem klinisch erfaßbaren Stadium befindet.

Ein Problem bei diesen Bestimmungen ist aber bisher immer noch die nicht sehr hohe Sensitivität der verwendeten Immunperoxidase-Tests mit EBV-produzierenden Zellen (Zeng et al., 1980), die aufgrund hoher Hintergrundreaktionen oft unspezifisch und schwierig auszuwerten sind. Während bei allen NPC-Patienten ein IgA/VCA-Titer nachgewiesen werden kann, gelingt dies in der IgA/EA Bestimmung nur bei 40-70%, je nach Studie. Das bedeutet, daß die Rate an falsch negativen Ergebnissen relativ hoch ist, und der Tumor dann erst entsprechend spät erkannt wird.

Diese Diagnose-Rate kann durch selektives Entfernen der IgG-Antikörper aus den Testseren mit Sephadex-gekoppeltem Protein A gesteigert werden. IgG-Antikörper, die in den NPC-Seren neben den IgA-Antikörpern immer in größeren Mengen vorhanden sind, können nicht mehr um die Antigenbindungsstellen konkurrieren. Auf diese Weise ist es mit den bisherigen Tests inzwischen gelungen, bei 100% der NPC-Patienten IgA/MA-Antikörper nachzuweisen, die, wie oben schon erwähnt, dieselbe diagnostische Signifikanz wie IgA/EA zu haben scheinen. Eine erste Studie an 40 Seren läßt es möglich erscheinen, daß diese Antikörper im Gegensatz zu IgA/VCA in der Normalbevölkerung nicht vorhanden sind (Pi et al., 1986). Es ist möglich, daß bei einer entsprechenden Verbesserung des IgA/EA-Tests oder der Verwendung von gereinigten, definierten Antigenen, dasselbe Resultat zu finden sein wird.

Die Diskrepanz der Aussagen, in der Normalbevölkerung sei kein IgA/EA-oder IgA/MA-Titer zu finden und den Werten von Tab.2 (z.B. von 30 IgA/EA-positiv Personen aus Wuzhou-Stadt weisen nur 9 ein NPC auf), ist damit zu erklären, daß es sich in Tab.2 um die Bevölkerung eines der Hochrisikogebiete von China

handelt. Wie schon erwähnt, wurde bei einer Anzahl dieser Personen in einer Folgestudie doch NPC diagnostiziert, was bedeutet, daß der Tumor zu diesem Zeitpunkt noch nicht klinisch manifest war.

4.4. EBV-korrelierte Lymphome in Immundefizienten Personen

Patienten mit einer verminderten oder gestörten Immunabwehr wie z.B. XLP (X-linked lymphoproliferative syndrome) oder mit AIDS sowie Personen, die nach Transplantationen massiv immunsupprimiert werden, sind nicht mehr in der Lage, latent EBV-tragende B-Lymphozyten unter Kontrolle zu halten. Als Folge davon können sich mono- und polyklonale EBV-positive B-Zell Lymphome entwickeln (Penn und Starzl, 1972; Ziegler et al., 1982). Auch bei dieser Patientengruppe ist ein erhöhter Antikörpertiter gegen EBV-Proteine zu finden, der für Diagnose und Verlaufskontrolle verwendet werden kann.

5. Aufgabenstellung

Die Hauptschwierigkeit bei der Untersuchung der Biologie des Epstein-Barr Virus und bei der Diagnostik seiner assoziierten Krankheiten ist das Fehlen einer permissiven Zelllinie. Aufgrund dessen sind die EBV-positiven B-Zelllinien mit ihrer geringen Produktion die einzige Quelle von EBV-Proteinen. Da die Diagnostik EBV-korrelierter Krankheiten meist auf serologischen Bestimmungen beruht, werden EBV-Antigene benötigt. Man verwendet bis jetzt meist Immunfluoreszenz-Tests. Dabei werden die Zellen, wie etwa Raji oder B95-8 auf Objektträger aufgebracht. Im Falle der EA-Bestimmung werden induzierte Raji-Zellen verwendet, bei denen der Zyklus aufgrund von Genom-Deletionen nur bis zum frühen Stadium ablaufen kann. Nach der Fixierung der Antigen-tragenden Zellen werden sie mit Patientenseren inkubiert. Gebundene Antikörper werden dann mit einem zweiten anti-human IgM, IgG oder IgA-spezifischen, FITC-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Die Auswertung muß unter dem Mikroskop erfolgen und ist dementsprechend aufwendig und zeitraubend. Da vor allem Seren von chronisch Kranken oder Tumorkranken häufig Antikörper gegen zell-eigene Proteine haben, ist es notwendig, daß die Auswertung von geschulten Personen vorgenommen wird.

Es gibt Bestrebungen, diese aufwendigen Tests durch partiell gereinigte Virusantigene und die Verwendung von Immunperoxidase Tests zu vereinfachen. Der Vorteil dabei ist, daß durch die enzymatische Entstehung eines Farbkomplexes die Auswertung maschinenlesbar wird. Bei dieser Methode kann nicht mehr auf-

grund von Zell-Lokalisation zwischen spezifischer und unspezifischer Reaktion unterschieden werden. Die Aussagekraft dieser aus Gründen der Handhabung erstrebenswerten Methode hängt wesentlich davon ab, ob hochreine Antigene zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, auf gentechnologischem Weg EBV Proteine zu produzieren, die dann als definierte und reine Antigene im ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) eingesetzt werden können. Die Antikörperbestimmung sollte damit eine erhebliche Steigerung der Sensitivität und Verringerung des Zeitaufwandes mit sich bringen.

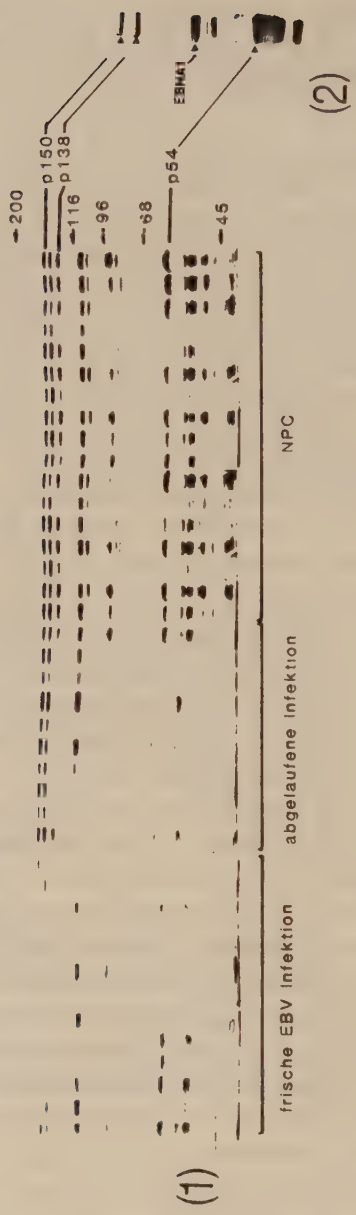
Von jeder Antigengruppe sollte mindestens ein Protein produziert werden, um sämtliche Möglichkeiten der Diagnostik abzudecken.

Dazu war es zunächst notwendig, diagnostisch relevante Antigene auszuwählen und diese mit Leserastern des sequenzierten EBV-Genoms zu korrelieren. Durch Immunpräzipitationen von [³⁵S]-markierten EBV-Proteinen mit verschiedenen Seren konnte gezeigt werden, daß zwei 'early' Proteine mit Antikörpern der IgG-Klasse von allen NPC-Seren erkannt wurden und mit IgA-Antikörpern ebenfalls eine sehr gute Reaktion zeigten (Wolf et al., 1985). Es handelte sich dabei um die schon früher angesprochenen EA-Proteine p54 und p138, deren Lokalisation auf den BamHI-M bzw. -A Fragmenten bekannt war (Seibl und Wolf, 1985; Abb.1). Daneben ergaben sich noch eine Reihe anderer kleinerer Proteine die ebenfalls von NPC-Seren erkannt wurden, deren Korrelation mit bestimmten EBV-Genomabschnitten bis jetzt aber noch nicht eindeutig möglich ist.

Als ein Vertreter der VCA-Gruppe wurde das ebenfalls schon erwähnte p150 gewählt, das mit NPC Seren gut reagiert und dessen Leseraster auf den BamHI-c und -D Fragmenten liegt (Abb.1).

Da Antikörper gegen EBNA-I ein sicheres Indiz für einen Kontakt mit dem Virus sind, aber bei bestimmten Immundefekten fehlen und damit differential-diagnostisch interessant sind, sollte auch dieses Protein produziert werden.

Schließlich erscheint es noch sinnvoll, die Hauptkomponente des viralen Envelopes, das Protein gp250/350, zu produzieren. Dies sollte aus zwei Gründen erfolgen: einmal für die Diagnostik, da sich eine hohe NPC-Korrelation ergibt (Pi et al., 1986; Zhu et al., 1986). Der zweite Grund ist die sehr wichtige Möglichkeit einer Vakzine-Herstellung.



(3)

Abb.1 Legende siehe nächste Seite

Abb. 1 Diagnostisch relevante EBV-Antigene

- (1) 10%-SDS PAGE von [³⁵S]-markierten, induzierten P3HR1 Zellen nach Immunpräzipitation mit verschiedenen Seren (frische EBV-Infektion, abgelaufene Infektion, NPC). Molekulargewichte am rechten Rand sind in kDa. Da die Immunpräzipitation mit Protein A durchgeführt wurde, werden die IgG-Antikörper analysiert. IgG-Titer gegen das p150 (VCA), p138 und p54 (EA) sind in NPC Seren immer vorhanden.
- (2) 10%-SDS PAGE, Western Blot und Immunfärbung von induzierten P3HR1-Zellen mit NPC-Serum Pool und Nachweis von gebundenem IgA. Gegen p150, p138 sowie p54 sind IgA-Titer vorhanden. Daneben wird noch EBNA-1 erkannt, das sich mit [³⁵S]-Markierung nicht darstellen läßt. Die beiden SDS-PA Gel Analysen wurden freundlicherweise von R.Kühbeck aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.
- (3) Lokalisation der Proteine auf dem EBV-Genom (verändert nach Seibl und Wolf, 1985). Dargestellt ist das lineare, 172kb lange Genom mit BamHI Schnittstellen sowie die Zuordnung von p54, gp250/350, EBNA-1, p150 und p138 zu BamHI-Fragmenten. Diese Daten wurden aufgrund von in vitro Translation mit hybridselektionierter mRNA erhalten. gp250/350 ist durch SDS-PAGE von P3HR1-Zell-Lysaten nur schlecht darstellbar; seine diagnostische Relevanz ergibt sich aus der Tatsache, daß neutralisierende Antikörper gegen dieses Protein gerichtet sind und, daß es einen hohen Aussagewert für die Diagnose von NPC hat.

Die fünf für einen diagnostischen Anwendungsbereich ausgewählten Proteine, p54, p138, p150, EBNA-1 und gp250/350 sollten in Bakterien (*E.coli*) exprimiert werden. Hierzu standen pUC-Vektoren mit dem lacZ Promotor und Operator sowie einer darauffolgenden multiplen Klonierungsstelle zur Verfügung. Da die Expression von eukaryotischen Proteinen oder Teilen davon in *E.coli* aufgrund von Größe bzw. Stabilitätsproblemen oft nicht möglich ist (Weis et al., 1983), sollten diese Proteine als β -Gal- (Rüther und Müller-Hill, 1983) oder autologe Fusionsproteine produziert werden. Ein autologes Fusionsprotein besteht aus fusionierten Segmenten desselben Proteins mit stabil exprimierbaren Teilen, die weitere Segmente stabilisieren, welche zwar als Immunogen erkannt werden, aber ohne Fusionspartner in der *E.coli* Zelle degradiert werden.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit bildet die Expression in eukaryotischen Zellen. Zwei Systeme wurden dabei verwendet: einmal die Expression mit Hilfe eines retroviralen Genoms (MSV) und der Transformation von 3T3-Zellen als Marker.

Für einen zweiten Ansatz wurden CHO (Chinese hamster ovary) Zellen gewählt, die eine Deletion des Dihydrofolatreduktase Gens aufweisen. Ein Expressionsvektor sollte für diese Zellen konstruiert werden, der neben diesem Gen, das eine Selektion nach Transfektion erlaubt, noch die Regulations- und Prozessie-

rungs-Sequenzen für die Expression eines zweiten Gens enthält. Die EBV-kodierten Glycoproteine, gp250/350, deren Expression mit Hilfe dieses Vektors vorgesehen war, sollten ähnliche Glycosylierungen wie die authentischen viralen Produkte aufweisen.

Obwohl gezeigt wurde, daß neutralisierende Antikörper gegen den Proteinteil gerichtet sind (Morgan et al., 1984) und damit eine Produktion in *E.coli* ausreichend wäre, erscheint eine Produktion der Glycoproteine sinnvoll, denn es gibt bisher wenig Daten über die Immunabwehr bei EBV und deren zelluläre Mechanismen, so daß eine Produktion möglichst des kompletten Proteins wichtig sein könnte. Ein anderer Grund ist die Reinigung des Expressionsprodukts, die aus Bakterien bei höchsten Anforderungen (Pyrogenfreiheit) relativ schwierig ist, während bei einer eukaryotischen Expression die Reinigung leichter sein sollte. Um die Ausbeute an Expressionsprodukt und die Reinigung zu vereinfachen, sollte noch versucht werden, dieses Glycoprotein ohne die Transmembran-Verankerung in den CHO-Zellen zu exprimieren. Als Folge davon würde die Verankerung in der Membran unterbleiben, und die Proteine sekretorisch werden, womit die Reinigung aus dem Kulturüberstand wesentlich einfacher wäre.

B. Material und Methoden

1. Biologisches Material

1.1. Bakterienstämme

Für den Großteil der Klonierungen und Expressionsversuche wurde der E.coli Stamm JM109 (recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ^- , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^{qZ} Δ M15]) benutzt (Yanisch-Perron et al., 1985). Er besitzt als wichtigste Merkmale die Überproduktion des lacI-Genprodukts (für die Repression von lac-Promotoren) sowie eine Deletion im 3' Bereich des chromosomalen lacZ-Gens. Durch eine α -Komplementation mit dem pUC-Vektor ko-dierten lacZ α -Peptid erhält diese verkürzte β -Gal wieder eine Aktivität. Darüber hinaus ist der Stamm noch recA1⁻, so daß er eine verringerte Rekombinationshäufigkeit aufweist.

JM83 (ara, Δ (lac-proAB), strA, Ø80, lacZ Δ M15) besitzt ebenfalls die Deletion im lacZ-Gen. Im Unterschied zu JM109 ist er kein lacI-Überproduzent, so daß lac-Promotoren von Plasmiden konstitutiv transkribiert werden (Yanisch-Perron et al, 1985).

Beide Stämme, sowie der Minizell-produzierende E.coli Stamm DS410 wurde von M.Bröcker, Behring-Werke, Marburg, zur Verfügung gestellt.

Von U.Schwarz, TU München, stammte der dam⁻ Stamm GM161 (CGSC 6476). Er wurde benutzt, um Plasmide ohne dam-Methylierungen zu isolieren, die für einen BclI-Verdau benutzt werden konnten.

Alle Stämme wurden in L-Broth gezogen (10g Trypton, 5g Hefe Extrakt, 5g NaCl pro l).

1.2. Plasmide

Für die Konstruktion von Expressionsvektoren und die Expressionsversuche wurden hauptsächlich pUC-Plasmide benutzt, die von M.Bröcker und J.Messing, Universität von Minnesota, erhalten wurden (pUC8, pUC9, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19) (Vieira und Messing, 1982; Yanisch-Perron et al, 1985). Die 2.7kb großen Vektoren vermitteln eine Resistenz für Ampicillin und tragen den 5'-Bereich von lacZ (lacZ α) mit dem lacUV5 Promotor und Operator. Nach dem Codon

für die sechste β -Gal Aminosäure sind Oligonukleotide eingefügt, die verschiedene Restriktionsenzym-Schnittstellen darstellen und sich in den einzelnen pUC-Vektoren durch Orientierung und Länge unterscheiden. Abb. 2 gibt einen Überblick der Schnittstellen, Orientierung sowie der resultierenden lacZ Leseraster. Das pUC-kodierte lacZ α -Peptid ist in der Lage nach α -Komplementation mit dem chromosomalen β -Gal Anteil ein aktives Enzym zu bilden. Wenn die Klone auf Agar Platten mit X-Gal (40 μ g/ml) und im Fall von JM109, mit IPTG ausplattiert werden, bilden sich blaue Kolonien. Im Gegensatz dazu erscheinen Bakterien mit pUC Vektoren, die eine Insertion tragen, als weiß, da der Leseraster des lacZ α -Transkripts unterbrochen ist. Wenn bei kleineren Einfügungen der Leseraster am 5' und 3' Ende stimmt, ist es möglich, daß dennoch blaue Kolonien entstehen, die allerdings eine wesentlich geringere Intensität aufweisen. Das lacZ α -Peptid ist trotz Fusion mit einem fremden Proteinteil noch in der Lage eine verminderte α -Komplementation zu erlauben. Die β -Gal Expressionsvektoren pUR278, 228, 289, 290, 291, und 292 stammen von U.Rüther, EMBO, Heidelberg. Sie weisen am 3'-Ende der β -Gal eine multiple Klonierungsstelle auf. Die sechs Vektoren unterscheiden sich durch Leseraster und Restriktionsenzym-Stellen. Abb.2 zeigt ein Schema dieser Vektoren sowie Leseraster und Schnittstellen (Rüther und Müller-Hill, 1983).

Der verwendete m13mp8-Phage besitzt dieselbe lacZ α -Insertion wie der pUC8-Vektor (Vieira und Messing, 1982).

Der Vektor pNIIIAl besitzt neben dem β -Lactamase Gen den Promotor und Translationsstart des E.coli Lipoprotein-Gens (lpp) sowie eine multiple Klonierungsstelle unmittelbar nach Translationsstart mit EcoRI, HindIII und BamHI. Reguliert wird die Transkription zusätzlich noch vom lacUV5 Promotor und Operator, der zwischen lpp-Promotor und -Translationsstart sitzt (Masui et al, 1984).

Expressionsvektoren mit tac-Promotoren, pMF1 (Amann et al., 1983) und pKK240 (Amann und Brosius, 1985) wurden ebenfalls von M.Bröker zur Verfügung gestellt.

Die provirale Moloney Sarcom Virus Sequenz, kloniert in die EcoRI-Stelle von pBR322 (pMSV_{INT}; Stratowa et al.,1982) stammte von J.Doeheimer, MPI, Martinsried.

pAdD26SV (Kaufman und Sharp, 1982a) und pSVE (Braethnach und Harris, 1983), die als Ausgangsvektoren für die Konstruktion des Eukaryontenvektors dienten, wurden von R.Waidle, Boehringer Mannheim, Tutzing) zur Verfügung gestellt.

Klonierte BamHI-Fragmente in pBR322 (BamHI-A, -D, -K, -L, -M; Skare und Strominger, 1980) stammten von J. Skare oder aus viraler DNA, die aus B95-8 Zellen gewonnen wurde. Das BamHI-c Fragment wurde von R.Seibl aus der Arbeitsgruppe von einem Charon-4A Phagen mit EBV Sequenzen (Buell et al., 1981) in pUC8 subkloniert.

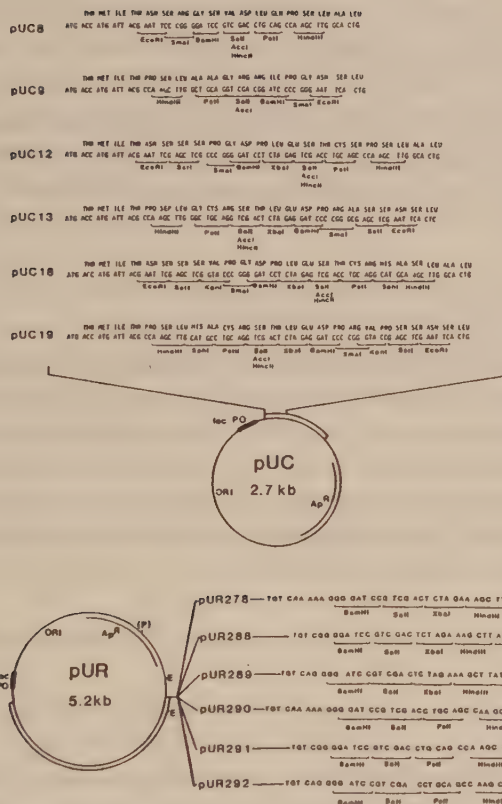


Abb. 2 Prokaryotische Expressionsvektoren, Restriktionsenzym-Schnittstellen und Leseraster.

Im oberen Teil sind pUC-Vektoren dargestellt. Die 2.7kb großen Plasmide besitzen neben dem Replikationsursprung (ORI) und β -Laktamase-Gen (Ap^R) den lacUV5 Promotor sowie Operator (lacPO) und einen offenen Leserahmen (offenes Segment), der das lacZ α -Peptid sowie je nach Vektor noch unterschiedlich lange pUC-Vektor Sequenzen kodiert. Die Unterschiede der einzelnen Vektoren im 5'-Bereich von lacZ mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen sowie resultierende Leseraster sind ebenfalls gezeigt.

Im unteren Bereich pUR Vektoren (5.2kb), Abkürzungen wie oben; P, PstI, E, EcoRI. Das offene Segment stellt die kodierende Region für die 116kDa große β -Galaktosidase dar. An deren 5'-Ende befinden sich die daneben gezeigten Restriktions-Schnittstellen mit den unterschiedlichen Leserastern. Bei pUR290, 291, 291 ist die PstI-Stelle im β -Laktamase Gen deletiert.

1.3. Eukaryotische Zelllinien

Die EBV-positiven Zellen (B95-8 und P3HR1) stammten aus der Arbeitsgruppe; 3T3-Zellen für die pMSV-Transformation von J.Doehermer. Die dhfr⁻ CHO-Zellen wurden von der Abteilung Hofschneider, MPI, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

1.4. Seren

Das NPC Pool-Serum stammte aus der diagnostischen Abteilung des Max von Pettenkofer-Instituts und war aus hochtitrigen NPC Seren vereinigt worden (antiEBNA, 1:1000; anti-VCA, 1:5000; anti-EA, 1:3000). Die individuellen NPC Seren wurden von Zeng Yi, Institute for Virology, Chinese Academy for Preventive Medicine, Beijing, China, zur Verfügung gestellt. Der monoklonale Antikörper gegen gp250/350 war von W.Jilg aus der Arbeitsgruppe etabliert worden.

2. DNA-Manipulationen

2.1. Präparation von Plasmid DNA

Diese und folgende Prozeduren stammen mit Abwandlungen aus Maniatis et al., 1982). 500ml L-Broth mit 50µg/ml Ampicillin (bzw. 25µg/ml Tetracyclin bei pAdD26SV) wurden mit einer 5ml-Übernachtskultur Bakterien beimpft und 16h bei 37°C geschüttelt. Bei Plasmiden, die nicht von pUC-Vektoren abstammten, erfolgte nach dem Erreichen einer OD von 0.6 die Zugabe von 50µg/ml Chloramphenicol, um Plasmidsequenzen zu amplifizieren.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10min, 5000rpm, A6.9-Rotor, Kontron) pelletiert und mit 10ml einer Lösung aus 50mM Tris-HCl, pH8.0, 50mM Glucose, 10mM EDTA und 5mg/ml Lysozym in einem 50ml Plastikzentrifugen-Röhrchen resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 20ml 0.2M NaOH und 1% SDS wurde das Lysat vorsichtig zwei- bis dreimal geschwenkt und anschließend 10min bei 0°C stehen gelassen. 15ml einer eiskalten Kaliumacetat-Lösung (60ml 5M K-Acetat, 11.5ml Eisessig und 28.5ml H₂O) wurden danach zugegeben und durchmischt.

Nach 10min bei 0°C wurde das entstandene SDS-Kalium-Protein Präzipitat bei

15krpm, 20°C, A8.24 Rotor (Kontron), pelletiert und der Überstand in ein frisches Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die darin enthaltene DNA kann nun mit 0.6Vol Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation gewonnen werden (12krpm, 20min, A8.24 Rotor, Kontron). Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol und Lyophilisation wurde das Pellet in 8ml-TE Puffer (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA) gelöst. Die Abtrennung von den bakteriellen chromosomalen Sequenzen erfolgte durch CsCl-Gleichgewichtszentrifugation (bei einem Ausgangs-Refraktionsindex von 1.3860 mit 10µg/ml Ethidiumbromid) in 60h bei 35krpm in einem Kontron TFT65-13 Rotor.

Mit einer Injektionsnadel wurde das Plastikzentrifugenröhrchen seitlich in Höhe der Plasmidbande angestochen und die DNA entnommen. Durch dreimaliges Ausschütteln mit NaCl-gesättigtem Isoamylalkohol kann das Ethidiumbromid entfernt werden. Nach zweistündiger Dialyse gegen TE Puffer wurde die DNA mit Ethanol gefällt, in 70% Alkohol gewaschen, lyophilisiert und in einem kleinen Volumen TE aufgenommen.

Zur Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsbestimmung wurde das Adsorptionsspektrum von 320 bis 220nm photometrisch gemessen. Die DNA-Konzentration (µg/ml) ergibt sich aus der Adsorption bei 258nm multipliziert mit 50.

2.2. Restriktionsenzym-Verdau

Für die Charakterisierung von Plasmiden oder von DNA Fragmenten genügten in der Regel 1-2µg, die in einem Volumen von 30µl mit 2-5 Einheiten des jeweiligen Enzyms (abhängig von der Anzahl der Schnittstellen) bei 37°C für 2-4h verdaut wurden. Der Verdau mit TaqI und BclI erfolgte bei 60°C. Als Puffer wurden die von den Herstellern empfohlenen Konzentrationen eingesetzt. Bei Doppelverdau mit Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Salzkonzentration (NaCl) benötigen, wurde zuerst das Enzym mit dem niedrigen Salzanspruch zugegeben, nach drei Stunden dann das zweite Enzym und die entsprechende NaCl-Menge. Für präparative Zwecke wurden 20-50µg Plasmid-DNA in 150-200µl Gesamtvolumen mit der entsprechend größeren Menge an Enzym verdaut. Bei Vektoren, die für Klonierungen nur mit einem Schnitt verdaut wurden, erfolgte anschließend eine Phosphatase-Behandlung (alkalische Phosphatase aus Rinderdarm, Boehringer) mit 0.05 Einheiten pro pmol DNA-Enden für 30min in 50mM Tris-HCl pH8.

2.3. Gelelektrophorese von DNA

Der Verdau mit Restriktionsenzymen wurde durch Stoppuffer (60% Saccharose, 50mM EDTA, 20m Tris pH7.5, 3% Bromphenolblau) beendet und die DNA-Fragmente durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Dabei wurden waagrecht Flachbett-Apparaturen verwendet; das Gel ist dabei mit Acetatpuffer (40mM Tris-Acetat, pH7.6; 70mM Na-Acetat, 7mM EDTA) überschichtet. Die Agarosekonzentration variierte dabei je nach den zu erwarteten DNA-Fragmentgrößen von 0.8% bis zu 2.5% für Fragmente der Größe um 100bp. Nach dem Auftragen der Proben (ca. 40µl) in die Geltaschen erfolgte die Auftrennung übernacht mit etwa 40V. Für die Überprüfung der Reinheit und der Konzentration von DNA Fragmenten wurde ein 'Minigel' (BRL) mit 20ml Gelvolumen benutzt, nach einer Laufzeit von 1h bei 60V war hier schon eine Auftrennung erfolgt.

Als Molekulargewichts-Standard wurde 1µg HindIII-verdaute lambda Phagen DNA mit aufgetragen.

Bei Gelelektrophoresen zur Charakterisierung von Plasmiden wurde Ethidiumbromid (150µg pro 100ml) mit in die noch flüssige Agarose gegeben. Bei Auftrennungen für präparative Zwecke wurde das Gel erst nach dem Auftrennen in Elektrophoresepuffer mit 40µg/ml Ethidiumbromid 1h angefärbt. Die Auswertung der DNA Banden erfolgte unter UV-Licht (302nm) und die Dokumentierung durch ein Polaroidfoto.

2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Bei DNA-Verdaus zur präparativen Gewinnung von Restriktionsenzym-Fragmenten wurde der Verdauansatz in mehreren nebeneinander liegenden Taschen des Agarosegels aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Agarosestücke kamen dann zusammen mit etwas Elektrophoresepuffer in kurze Dialyseschläuche, die zuvor einige Minuten in TE-Puffer gekocht worden waren und an beiden Enden mit Plastikklammern verschlossen wurden. Die Dialyseschläuche wurden in die Elektrophoresekammer gelegt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Agarosestücke in derselben Orientierung zu liegen kamen, die sie ursprünglich im Gel hatten, damit die DNA in der gleichen Richtung weiterwandern konnte. Nach einer Elektrophorese von 2-3 Stunden, je nach Größe der Fragmente und Agarosekonzentration, wurden die Agarosestücke aus den Schläuchen vorsichtig entnommen und durch Reiben der Membranen die an der Wand des Dialyseschlauches sitzende DNA wieder in Lösung gebracht.

Nach Entnahme der Flüssigkeit und einmaligem Auswaschen mit TE-Puffer, erfolgt die Reinigung und Konzentrierung mit einer Elutip-d Säule (Schleicher und Schuell). Die Elutip-d Säule war entsprechend den Herstellerangaben zuvor mit 1M NaCl-TE Puffer gewaschen und mit 0.2M NaCl-TE äquilibriert worden. Bei dieser NaCl-Konzentration bindet DNA an die Säulenmatrix.

Das Waschen, Äquilibrieren und Auftrag der DNA-Lösung geschah mit Hilfe einer 10ml-Spritze, auf die die Säule zusammen mit einem $0.45\mu\text{m}$ -Celluloseacetat-Filter aufgesteckt wurde. Der zusätzliche Filter soll eventuell vorhandene Agarosepartikel zurückhalten.

Die DNA-Lösung wurde langsam durch die Säule gedrückt und mit 2-3ml 0.2M NaCl-TE gewaschen. Anschließend wurde gebundene DNA von der Säule mit 0.4M 1M NaCl-TE in ein Eppendorf-Hütchen eluiert und mehrmals mit demselben Volumen Isoamylalkohol ausgeschüttelt, um Ethidiumbromid zu entfernen. Nach dem Füllen mit 1ml Ethanol, Zentrifugation der Eppendorf-Hütchen bei 17krpm im A6.24 Rotor für 20min und Waschen mit 70% Ethanol, wurde die DNA lyophilisiert und in 10-20 μl TE aufgenommen. Zur Überprüfung der Reinheit und für eine Abschätzung der Konzentration wurde ein Minigel mit dem DNA-Molekularstandard gefahren.

2.5. DNA-Ligierung

Die Mengen der DNA-Fragmente, die bei einer Ligierung eingesetzt wurden, variierten stark, je nach relativer Größe zueinander und den Restriktionsenzym-Schnittenden. Bei einer normalen Ligierung mit einem pUC-Vektor wurde von etwa 0.1 μg Vektor DNA und etwa einem dreifachen, molaren Überschuß des zu inserierenden DNA-Fragments ausgegangen. Die Ligierung erfolgte bei 14°C für 20h mit 1-2 Einheiten T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) in einem Puffer mit 50mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl_2 , 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rinderserum-Albumin und 10mM DTT (Dithiothreitol, Sigma). Bei Ligierungen mit Vektoren, die ein größeres Molekulargewicht als pUC aufweisen, wurde die entsprechend größere Menge eingesetzt, wie z.B. bei pUR (5.4kb) 0.2 μg . Wenn der Vektor mit nur einem Enzymschnitt linearisiert worden war, wurde, um die Menge an Klonen mit religiertem Plasmid zu verringern, neben der Phosphatasebehandlung (nach dem Verdau) die eingesetzte Vektormenge verringert (0.05 μg) und die der zu inserierenden DNA erhöht. Ebenso wurde bei Ligierungen mit glatten DNA-Fragment-Enden verfahren. Zusätzlich wurde hier noch mehr Enzym (3-4 Einheiten) eingesetzt und die Ligierung bei RT durchgeführt.

2.6 Transformation von Bakterien und Selektion

Für eine effiziente Aufnahme von DNA durch Bakterien wurden die Zellen zuvor nach der Methode von Hanahan (1983) kompetent gemacht. 100ml L-Broth wurden mit 3ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C geschüttelt bis die Zelldichte eine OD von 0.5-0.7 erreicht hatte. Die Kultur wurde für 10min bei 0°C abgekühlt und in einem A6.24 Rotor bei 5000rpm in 10min pelletiert. Die Bakterien wurden dann in 30ml kaltem FSB-Puffer (10mM K-Acetat, pH6.4, 100mM KCl, 45mM MnCl₂, 10mM CaCl₂, 3mM Hexamminkobalt-trichlorid und 10% Glycerin) resuspendiert und 15min auf Eis gestellt. Nach erneuter Pelletierung wurden die Zellen wieder in 8ml FSB-Puffer resuspendiert und 5min auf Eis gehalten. Zweimal 280µl DMSO, unterbrochen von 5 minütiger Inkubation auf Eis, wurden dann noch zugemischt und die Zellen anschließend in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Für die Transformation wurden jeweils 200µl der kompetenten Zellen zu dem Ligierungsansatz oder zu dem zu transformierenden Plasmid (0.1µg in 20ul TE) in Eppendorf-Hütchen gegeben und das Ganze dann in Glasröhrchen überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden der Ansatz für 2,5min in einem 43°C Wasserbad erwärmt und anschließend nach Zugabe von 1.5ml L-Broth in einem 37°C Wasserbad für 2h inkubiert.

Die Selektion von Bakterien mit Plasmid erfolgte durch Ausplattieren der Zellsuspension auf L-Broth Agar mit 50µg/ml Ampicillin und durch Inkubation bei 37°C für 16 Stunden.

Bei Klonierung mit pUC-Vektoren und JM109 wurde in den L-Broth Agar noch 1mM IPTG und 40µg/ml X-Gal zugegeben, um religierte Vektoren durch die phänotypische Ausprägung der blauen Koloniefarbe abgrenzen zu können.

2.7 Transformation von m13 Phagen-DNA

Analog zur Transformation von Plasmid-DNA wurde auch bei m13 der Ligationsansatz mit der RF-Form dieses Phagen und dem zu inserierenden Fragment durch Zugabe von kompetenten JM109 und Hitzeschock transformiert. Anschließend wurden je 10µl der Suspension zu 3ml 0.6%igen Agar gegeben, der bei 40°C flüssig gehalten worden war und 300µl JM109-Bakteriensuspension aus einer exponentiellen Wachstumsphase sowie 1mM IPTG und 40µg/ml X-Gal enthielt. Der Softagar wurde dann auf L-Broth Agar Platten ausgegossen. Aufgrund der vorgelegten 300µl Bakteriensuspension ergibt sich nach Übernachts-Inkubation bei 37°C ein Bakterienteppich in der dünnen Softagar-Schicht. Stellen, an denen

Bakterien mit dem transformierten Phagengenom zu liegen kamen, erscheinen als hellere Plaques in dem Teppich, da die Replikation und Ausschleusung des filamentösen m13-Phagen die Bakterien zwar nicht lysiert, aber doch in ihrem Wachstum hindert. Religierte Phagengenome erscheinen aufgrund der Spaltung von X-Gal als blaue Plaques, rekombinierte farblos.

2.8 Charakterisierung von rekombinanten Klonen

Von den nach Transformation selektierten Kolonien wurden jeweils einige von den Platten isoliert und in 5ml L-Broth mit Ampicillin übernacht bei 37°C geschüttelt. Von den Übernachtskulturen wurden Plasmid-Präparationen aus dem Pellet von 1.5ml Bakteriensuspension in Eppendorf-Hütchen gemacht. Jeweils 1ml wurde bei -70°C mit 15% Glycerin gelagert. Der Aufschluß der Bakterien und die Isolierung der Plasmide wurde ähnlich wie die in 2.1. beschriebene Großpräparation durchgeführt.

Mit 100µl einer eiskalten Lösung aus 25mM Tris pH8.0, 50mM Glucose, 10mM EDTA und 4mg/ml Lysozym wurde das Pellet resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 200µl mit 0.2N NaOH und 1% SDS bei 0°C und vorsichtiges Durchmischen.

150µl der K-Acetat Lösung (s. 2.1.) wurden nach weiteren 5min zugegeben, mit einem Vortex Schüttler durchmischt und das SDS-Kalium-Protein Präzipitat pelletiert. Aus dem Überstand wurden nach Überführung in ein frisches Eppendorf-Hütchen noch vorhandene Proteine durch Ausschütteln mit demselben Volumen Phenol/Chloroform (48 Vol% Phenol, 48 Vol% Chloroform, 4 Vol% Isoamylalkohol) ausgeschüttelt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Ethanol präzipitiert. Nach dem Waschen mit 70% Alkohol wurde die DNA lyophilisiert und in 50µl TE aufgenommen. Die Charakterisierung erfolgte dann durch Restriktionsenzym-Verdau in 30µl Gesamtansatz, wobei jeweils 5-10µl der DNA-Lösung eingesetzt wurde, sowie 2µl einer RNase-Lösung (aus 23µg/ml, Sigma), um kontaminierende bakterielle RNA zu entfernen.

Durch Verdau mit verschiedenen Enzymen und Einbeziehung der Sequenzdaten kann dann ausgesagt werden, ob und in welcher Orientierung die Insertion erfolgte.

Für weiterführende Klonierungen der rekombinanten Plasmide wurde meist nur eine Plasmid-Präparation aus 100ml einer Übernachtskultur nach der oben beschriebenen Methode und entsprechend größeren Volumen an Reagenzien durchgeführt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten für Ligierungen geschah dann durch Elektrophorese der verdauten Plasmide.

2.9. m13 Phagen

Die nach dem Ausplattieren des Ligierungsansatzes erhaltenen hellen Plaques wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette ausgestochen und die Bakterien mit den Phagen übernacht in 5ml L-Broth angezogen. Aus dem Pellet von 1.5ml-Bakteriensuspension wurde wie bei der Plasmidcharakterisierung die RF-DNA des Phagen isoliert und enzymatisch untersucht. Die Isolierung der ss-Form aus Phagenpartikeln erfolgte durch PEG-Fällung aus dem Überstand (1/5 Vol 20% PEG, Polyethylenglycol 6000, Merck; 1M NaCl) und Zentrifugation (5 min, Eppendorf-Zentrifuge).

Durch eine Phenolextraktion des in 200ul resuspendierten Pellets wurden die ss-DNA Form freigesetzt und Phagenproteine denaturiert. Nach Ethanolfällung, Waschen mit 70% Alkohol und Lyophilisation wurde die ss-DNA in 50µl TE aufgenommen, und nach Elektrophorese die Konzentration abgeschätzt. Sequenziert wurde die Insertionen von Peter Heinrich, Institut für Biochemie, München.

3. EBV-Antigen Nachweis in E.coli-Zellen

3.1. Präparation und Markierung von Minizellen

Der mit pUC635 transformierte DS410 Klon wurde in 2l L-Broth hochgezogen, pelletiert (5000rpm, AH6.24 Rotor, 4°C, 15min) und in 50ml 20mM Tris-HCl pH7.5 resuspendiert. Je 5ml dieser Suspension wurden auf einem linearen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Der Gradient war in Ultrazentrifugen Röhrchen für den Beckmann SW-27 Rotor aus einer 10% und 30% Saccharoselösung mit einem Gradientenmischer gegossen worden. Durch Zentrifugation in einem HIB-4 Ausschwing Rotor (Sorvall) bei 5000rpm für 20min bei 4°C werden normale Bakterien pelletiert, während die Minizellen als diffuse, weiße Bande in der Mitte des Gradienten durch seitliches Anstechen und Absaugen isoliert werden können.

Die Zellen wurden 1:2 mit 20mM Tris-HCl pH7.5 verdünnt, pelletiert (6000rpm, A6.24 Rotor, 10 min), wiederum in Tris resuspendiert und erneut durch einen Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Die zum zweiten Mal isolierten Minizellen wurden nach Pelletierung in M9-Medium (6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 0.5g NaCl, 1g NH₄Cl, 2mM MgSO₄, 0.2% Glucose, 0.1mM CaCl₂ ad 1000ml H₂O, pH7.4, Maniatis et al., 1982) aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 2.0 eingestellt.

Jeweils 150µl der Minizellsuspension wurden dann mit [³⁵S]-Methionin markiert, um Plasmid-kodierte Proteine zu analysieren.

Nach Zugabe von 40µl eines Gemisches mit allen Aminosäuren, außer Methionin, (Endkonzentration 0.2mM) wurde der Ansatz für 30min bei 37°C inkubiert, um eventuell noch vorhandene zelluläre Transkripte zu eliminieren.

Anschließend erfolgte die Markierung von Plasmid-kodierten Transkripten mit 30µCi [³⁵S]-Methionin für 2h. Danach erfolgte die Pelletierung der Minizellen und Lyse in 50µl SDS-PAGE-Auftragspuffer (siehe unten).

3.2. Induktion

Alle verwendeten Expressionsvektoren besitzen lacUV5 oder tac-Promotoren, die in dem verwendeten Stamm JM109 durch die Überproduktion des lacI-Genprodukts reprimiert sind. Für eine Induktion wurden Übernachtskulturen der jeweiligen Klone auf eine OD von 0.2-0.3 mit L-Broth/Ampicillin verdünnt und geschüttelt bis die Zelldichte eine OD von 0.7 erreichte. Durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1mM werden die Promotoren induziert. Nach zwei weiteren Stunden Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien pelletiert und entweder in SDS-Auftragspuffer lysiert oder für die Reinigung der EBV Antigene verwendet.

3.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Proteine wurden nach Lämmli (1970) in einem diskontinuierlichen Puffersystem aufgetrennt. Nach Induktion wurden 1.5ml Bakterienkultur pelletiert, in 200µl SDS-Auftragspuffer (2% SDS, 5% Mercaptoethanol, 3% Saccharose, 50mM Tris-HCl, pH7.0, 1% Bromphenolblau), resuspendiert und 5 min auf 100°C erhitzt. 10-20µl wurden pro Geltasche aufgetragen. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0.4mm ca. 12cm hoch gegossen und bestanden, je nach Größe der gesuchten Proteine aus 10-17.5% Acrylamid (Bio-Rad), 0.02% Diallyltartardiamid (DADT, Bio-Rad) pro Prozentanteil Acrylamid, 0.15% SDS, 0.375M Tris-HCl, pH8.5, 0.14mM Ammoniumperoxidisulfat (Bio-Rad) und 0.035% N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED, Bio-Rad). Nach der Polymerisation wurde dieses Gel mit einem Sammelgel überschichtet, in das der Kamm für die Probentaschen gesteckt wurde. Es bestand aus 3.1% Acrylamid, 0.08% DADT, 0.1% SDS, 0.125mM Tris-HCl pH7.0, 0.05% TEMED und 0.14mM Ammoniumperoxidisulfat. Die Elektrophorese wurde bei RT mit konstanten 5mA/cm² und mit 25mM Tris, 0.192M Glycin, 0.1% SDS pH8.5 in den Pufferbehältern durchgeführt bis die Bromphenolblau-Bande des Auftragspuffers des Gelende erreicht hatte. Als Molekulargewichtsmarke wurde ein Gemisch aus folgenden Proteinen mit aufge-

tragen: Myosin, 200kDa; β -Galaktosidase, 116kDa; β -Phosphorylase, 96kDa; Rinder-Serumalbumin, 68kDa; Ovalbumin, 45kDa und Carbanhydrase, 30kDa (Sigma). Für das Fixieren und Anfärben der Proteinbanden wurden die Gele in Essigsäure, Isopropanol/Wasser (1/1/4) mit 0.5% Coomassie-Blau (Coomassie Brilliant Blue, Bio-Rad) geschüttelt und anschließend in derselben Lösung ohne Coomassie-Blau entfärbt. Durch Hitze und Vakuum erfolgte anschließend eine Fixierung und Trocknen auf Whatman-3MM-Papier.

Bei Gelen mit radioaktiven Proben wurden die Proteine des Standards mit ^{14}C -Tinte markiert und die Gele auf ^3H Ultro-Film (LKB) exponiert.

3.4. Western Blot

Proteine wurden nach der SDS-PAGE durch Elektrophorese auf Nitrocellulose transferiert (Burnette, 1981). Dabei liegt das Gel auf Nitrocellulose zwischen Whatman-3MM-Papier, leitfähigem Schaumstoff und zwei Kohleplatten, über die die Stromübertragung erfolgt. Schaumstoff und Filterpapier werden gut mit Blotting-Puffer getränkt (192mM Glycin, 25mM Tris, pH 8.5 und 20% Methanol). Der Transfer findet bei $3\text{mA}/\text{cm}^2$ in 1.5-4 h statt, abhängig von der Acrylamidkonzentration des Gels. Danach wurde die Nitrocellulose mit Cohen Puffer (Cohen G.H. et al., 1984; 1mg/ml Ficoll 400, 1mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 16mg/ml Rinderserumalbumin, 0.1% Nonidet-P40, 0.05% Gelatine, 170mM Borat, 150mM NaCl) für 2h abgesättigt; anschließend erfolgt die Inkubation mit Antikörpern übernacht bei RT. Die Seren wurden dazu mit TBS-Puffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 154mM NaCl) 1:50 verdünnt. Die Filter wurden dann mit Gelatine-Puffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.25% Gelatine, 0.5% Triton X100, 0.1%SDS) für 4h bei mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen und anschließend für 2h mit Peroxidase-gekoppeltem, anti-humanem IgG, IgA oder IgM Kaninchen Immunglobulin (Dakopatts; 1:500 verdünnt in TBS) inkubiert und danach wieder mit Gelatinepuffer ausgiebig für 1h gewaschen. Gebundene Antikörper auf dem Filter wurden schließlich durch Peroxidasereaktion in 100ml einer Lösung mit 0.5mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma), 0.01% H_2O_2 und 50mM Tris-HCl pH7.5 sichtbar gemacht. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 1N Schwefelsäure.

4. Reinigung von Expressionsprodukten aus Bakterien

Nach Induktion und Pelletierung von 2l Bakterienkultur erfolgte die Lyse durch Inkubation bei 37°C in einer Lösung mit 1mg/ml Lysozym, 50mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH7.5 für 30-45 min und Ultraschallbehandlung für 2x8 min bei

400W (Labsonic 1510, Branson). In manchen Fällen wurde noch Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Das Lysat wurde bei 17krpm im A6.24 Rotor zentrifugiert und das Pellet in 4M Harnstoff, 0.1% Mercaptoethanol suspendiert und übernacht bei RT gerührt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das resultierende Pellet in 8M Harnstoff, 0.1% Mercaptoethanol gelöst und der lösliche Proteinanteil für die weitere Reinigung verwendet. Im Falle von β -Gal Fusionsproteinen geschah dies durch Sepharose 2B-CL (Pharmacia) Molekularsieb Chromatographie in 8M Harnstoff in einer Säule mit 100cm Länge und 3cm Durchmesser; aufgetragen wurden ca. 80mg des Proteingemisches. Als Puffer diente dabei 20mM Tris-HCl pH7.5 und 8M Harnstoff. Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-blau Färbung analysiert. Fraktionen mit dem aufgetrennten β -Gal Fusionsproteinen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60% Sättigung) gefällt. Nach dem Resuspendieren in einem Volumen von 10-20ml und erneuter Dialyse wurden die Proteine für die Immunisierung von Kaninchen oder ELISA verwendet.

5. ELISA

Jeweils ca 0.1-1 μ g der gereinigten Expressionsprodukte wurden nach Verdünnung in 200 μ l Carbonatpuffer (0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH9.5, 0.25M NaCl) übernacht an 96-Löcher ELISA-Platten (Dynatech) gebunden. Nach Waschen mit PBS (143mM NaCl, 3mM KCl, 0.75mM Na_2HPO_4 , 1mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2) und Absättigung (1% Rinderserum-Albumin und 1% Kaninchenserum, Dakopatts) erfolgte eine zweistündige Inkubation mit den Patientenseren im Doppelansatz und Verdünnungen. Anschließend wurde mit Gelatinepuffer gewaschen, dann je nach Test Peroxidase-gekoppelte anti-human IgG- oder IgA-Kaninchen Antikörper (Dakopatts) in einer PBS-Verdünnung von 1:500 zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Adsorption der Peroxidase-Färbreaktion wurde in einem ELISA-Photometer (Kontron) bestimmt.

6. Immunisierung

Kaninchen wurden dreimal in Abständen von zwei Wochen mit je ca. 500 μ g der gereinigten Expressionsprodukte immunisiert. Die erste Injektion erfolgte mit einer 1:1-Mischung von komplettem Freund'schen Adjuvans, die weiteren mit inkomplettem. 3 und 6 Wochen nach Immunisierung wurde Serum entnommen und mit Immunfluoreszenz an EBV-positiven Zellen getestet (siehe unten). Die Immunisierungen wurden freundlicherweise von W.Jilg durchgeführt.

7. Transfektionsexperimente

7.1. 3T3-Zellen

Die 3T3 Monolayer-Zellen wurden in RPM1640 (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco), 7.5µg/ml Glutamin, 200IE/ml Penicillin und 200µg/ml Streptomycin gezogen und alle 3-4 Tage 1:2 gesplittet.

Für die Transfektion mit dem retroviralen Vektor pMSV und inserierten EBV-Fragmenten wurden jeweils 1×10^6 Zellen in Zellkulturschalen mit 9cm Durchmesser gebracht. Nach 4 Stunden, wenn die Zellen angewachsen waren, wurde mit der Transfektion gestartet (Graham und van der Eb, 1973).

Der dazu benutzte Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 0.05g HEPES, 0.01g Dextrose, 0.08g NaCl, 3.7mg KCl, 1mg Na_2HPO_4 in 10ml bei einem pH Wert von 7.01-7.06. Nach einer Sterilfiltration durch 0.22µm wurden davon je 918µl in ein Eppendorf-Hütchen vorgelegt.

Anschließend wurden 30µl einer DNA-Lösung zupipettiert, die 2.5µg des Plasmids sowie 25µg 3T3-Zell-DNA als Carrier enthielt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgte die Präzipitation dieser DNA mit 52.6µl einer frischen 2.5M CaCl_2 -Lösung (Endkonzentration 0.125M). Das Präzipitat wurde nach 30min bei RT auf die 3T3 Zellen gegeben, von denen zuvor das Medium entfernt worden war. Nach weiteren 30min Stehen bei RT wurde wieder Medium zugegeben und 4h bei 37°C inkubiert.

Das DNA-Präzipitat erscheint im Mikroskop als feiner, dunkler Staub auf den Zellen, die anschließend dreimal mit Medium gewaschen und wieder übernachtet bei 37°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte eine 1:10 Aufsplittung der Zellen in neue Kulturschalen und Mediumwechsel alle 5 Tage.

Nach 10-14 Tagen erschienen Foci auf den Monolayer-Zellen, die mit einer Plastik-Impföse abgelöst und isoliert wurden.

7.2. CHO-Zellen

Das Wachstum dieser Zellen erfolgte in α Medium (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum, 200 IE/ml Penicillin, 200µg/ml Streptomycin und 7.5µg/ml Glutamin. Bei der Transfektion von pMDIII-Vektoren in die Zellen wurde genauso wie bei 3T3 Zellen verfahren, aber anstatt Carrier-DNA zuzugeben, wurden 25µg reine Plasmid-DNA verwendet.

Die Aufteilung der Zellen nach Transfektion erfolgte erst nach 48h, für die

Selektion von dhfr⁺ Zellen wurde α -Medium verwendet, das frei von Nukleotiden ist. Um diese auch aus dem Kälberserum zu entfernen, wurde es drei Tage bei 4°C mit mehreren Wechseln gegen PBS dialysiert.

Nach jeweils fünf Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Die sich nach 10-14 Tagen entwickelnden Zellkolonien wurden mit einer Plastikimpföse von der Platte gelöst und durch Aufziehen in einer Pasteur-Pipette mit einem Tropfen Medium isoliert.

8. Immunfluoreszenz

Für die EBNA-1 Fluoreszenz wurden die 3T3-Zellen in 1.5cm Schalen gezogen und durch Behandlung mit Aceton/Methanol (1:1) für 3 min bei -20°C fixiert. Nach dem Abgießen und Trocknen wurde 1ml eines 1:50-verdünnten, hochtitrigen anti-EBNA-1 Serums mit Komplement aus der diagnostischen Abteilung des Instituts zugegeben und 2h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schalen 5-6 mal mit PBS gewaschen, 1ml einer 1:100 Verdünnung eines FITC-konjugierten anti-Komplement Antikörpers (Dakopatts) zugegeben und erneut für 1h inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz im Mikroskop unter UV-Licht analysiert. Der Membranfluoreszenztest von pMDIIIIGP transfizierten CHO-Zellen erfolgte ähnlich, nur wurden die Zellen nicht fixiert, sondern die Prozedur an ganzen Zellen bei 4°C durchgeführt. Dabei wurde ein anti-gp250/350 monoklonaler Antikörper verwendet, der von W.Jilg aus der Arbeitsgruppe etabliert worden war. Der Nachweis erfolgte mit Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörpern, die mit FITC gekoppelt waren (Dakopatts).

9. Radioaktive Markierung von Zellproteinen

9.1. Iodinierung

CHO-Zellen wurden in einer 25ml-Kulturflasche gezogen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30min mit 200 μ Ci Na¹²⁵I bei RT in Anwesenheit von 2 μ M Lactoperoxidase und 0.2 μ M Glucose-Oxidase und 1% H₂O₂ inkubiert (Jilg und Wolf, 1985). Für die Oberflächenmarkierung von B95-8-Zellen wurden dieselben Bedingungen bei einer Zellkonzentration von 1x10⁷/ml verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden ¹²⁵I-markierte Oberflächenproteine mit 0.5% Nonidet P-40 in Anwesenheit von 1mM PMSF und 200KIU/ml Trasylol (Bayer) extrahiert. Freies Iod wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-25 (Pharmacia) abgetrennt.

9.2. ^{35}S -Methionin-Markierung von P3H1 Zellen

Für die Untersuchungen mit markierten EBV-Antigenen wurden pro Geltasche 1×10^6 HIRIK Zellen eingesetzt, die zuvor für zwei Tage mit $40 \mu\text{g/ml}$ Phorbol-ester (TPA) und 3mM Buttersäure induziert worden waren. Die Zellen wurde pelletiert (800rpm , 10min) und in $300 \mu\text{l}$ MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) ohne Methionin mit 5% fötalem Kälberserum, $40 \mu\text{g/ml}$ TPA und $20 \mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S]-Methionin übernacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in $100 \mu\text{l}$ Immunpräzipitationspuffer lysiert.

9.3. Hybrid-selektionierte *in vitro* Translation

$8 \mu\text{g}$ pUC635 Plasmid-DNA in $50 \mu\text{l}$ TE wurden in einem Wasserbad dreimal 60sec beschallt und anschließend für 10min auf 100°C erhitzt. Die entstandenen Einzelstrang-Fragmente wurden dann auf einen $5 \times 5 \text{mm}$ großen Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schuell) getropft, bei 4°C getrocknet und nach Waschen mit $6 \times \text{SSC}$ bei 80°C für 2h gebacken.

Die Hybridisierung mit gesamter, zytoplasmatischer P3H1-RNA erfolgte in einem Volumen von $100 \mu\text{l}$. Dazu wurden $100 \mu\text{g}$ RNA in einer Lösung aus 65% Formamid, 0.4M NaCl und 20mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure (Pipes, Sigma) $\text{pH} 7.0$ bei 52°C für 2.5h mit dem Nitrocellulose-Filter inkubiert. Nach Waschen mit je 1ml $1 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS bei 62°C (10mal) sowie mit 2m EDTA (3mal) wurde die gebundene RNA vom Filter durch Erhitzen auf 100°C für 75sec in $300 \mu\text{l}$ H_2O eluiert. Nach Zugabe von $20 \mu\text{g}$ Kalbsleber-tRNA (Boehringer) wurde die RNA mit Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in $3 \mu\text{l}$ H_2O aufgenommen. Nach Erhitzen auf 70°C für 90sec wurde die RNA in einem Translationsansatz bei 30°C für 2h mit $1,5 \text{mCi/ml}$ [^{35}S]-Methionin eingesetzt. Als Kontrolle wurde zytoplasmatische RNA in einer Konzentration von $300 \mu\text{g/ml}$ verwendet. Der Translationsansatz mit dem Kaninchen-Retikulozytenlysat, die Zusätze an Aminosäuren, Nukleotid-triphosphaten und Puffer wurden freundlicherweise von R.Seibl aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Ebenso wie die Bedingungen für die hybrid-selektionierte Anreicherung von RNA stammten auch die *in vitro* Translationsbedingungen von ihm.

9.4 Immunpräzipitation

Die radioaktiv-markierten EBV-Proteine der [^{35}S]-Methionin-markierten P3HR1-Zellen oder aus dem Translationsansatz wurden in 1ml A-SDS Puffer (1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.137% NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10% Glycerin, 1mM PMSF und 20mM Tris pH9.0) aufgenommen, wobei die Zellen lysiert wurden.

Anschließend wurde das Lysat mit dem NPC-Serum übernacht bei 4°C inkubiert. Eingesetzt wurden dabei 10 μl Serumpool, der zuvor mit 90 μl eines Extraktes von EBV-negativen BJA-Zellen (entspricht ca 10^7 Zellen) adsorbiert worden war. Bei der gp250/350-Immunpräzipitation wurden IgG-gereinigte, monoklonale Antikörper zu dem NP40-Zell-Extrakt gegeben.

Durch Zugabe von 3mg Protein A-Sepharose (Pharmacia), die zuvor in 100 μl A-SDS gequollen war, erfolgte die Anbindung der IgG-Antikörper für 3h bei RT. Danach wurden die Protein A-Komplexe abzentrifugiert, dreimal mit A-SDS Puffer sowie zweimal mit H_2O gewaschen, schließlich in 40 μl SDS-PAGE Auftragspuffer aufgenommen und für 5' bei 100°C gekocht, wobei sich die Proteine wieder von der Protein A-Sepharose lösen und nach SDS-PAGE analysiert werden können.

10. DNA- und RNA-Nachweis

10.1. Isolierung von DNA und RNA aus CHO-Zellen

Die Zellen aus 8 großen Kulturflaschen (ca 2×10^7 Zellen) wurden nach dem Waschen mit PBS direkt durch Zugabe von je 1ml NGM (50mM NaAc, pH5.5, 4M Guanidiniumisothiocyanat, 0.5M Mercaptoethanol) lysiert und mit weiteren 2ml NGM aus den Flaschen pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 20 krpm für 1h, 5°C in einem SW41 Rotor zur Pelletierung von Zell-Debris wurde das Lysat auf CsCl-Kissen pipettiert. Dieses Kissen bestand aus zwei Schichten mit 1.8g/ml (2ml) und 1.5g/ml (3ml) CsCl in TEA Puffer (10mM Triethanolamin pH7.4, 1mM EDTA). Durch Zentrifugation bei 20°C, 35 krpm im SW41 Rotor wird die RNA pelletiert, während die DNA aufgrund ihrer geringeren Dichte nur durch das obere 1.5g/ml CsCl-Kissen wandert (Chirwin et al., 1979).

Mit einer Pasteurpipette, wurde das Lysat mit der obersten Schicht des 1.5g/ml CsCl-Bereiches abgesaugt und dann die Zell-DNA entnommen. Nachdem das CsCl bis auf einen Rest von etwa 0.5ml abgesaugt worden war, wurden 200-300 μl

TEA- Puffer zugegeben, das RNA-Pellet resuspendiert und gelöst.

Für die DNA Präparation wurde die entsprechende 1.5g/ml CsCl-Fraktion in TE- Puffer dialysiert (3h), mit TE-gesättigtem Phenol sowie Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, Ethanol gefällt (mit 0.25M NaCl), nach dem Waschen mit 70% Ethanol lyophilisiert und die Konzentration bestimmt.

Die RNA Fraktion wurde nach dem Lösen mit Phenol/Chloroform behandelt, auf 0.25M NaCl eingestellt und Ethanol gefällt. Falls dabei CsCl auskristallisierte, wurde es durch Zugabe von 70% Ethanol wieder in Lösung gebracht. Nach Pelletierung, Waschen, Lyophilisation und Lösen in H₂O wurde ebenfalls die Konzentration gemessen, wobei eine OD von 1.0 37µg/ml RNA entsprechen.

10.2. Southern Blot

Von der chromosomalen CHO-DNA wurden je 10µg in 40µl mit Restriktionsenzymen verdaut und durch Elektrophorese in 1.0%iger Agarose aufgetrennt. Nach Kontrolle des Verdau unter UV-Licht (es entsteht ein DNA-Schmier) und Markierung der DNA-Banden des Standards, wurde das Gel für 30min in 1.5M NaCl, 0.5M NaOH geschüttelt und anschließend in 3M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7 für zweimal 30min neutralisiert. Das Gel wurde dann auf zwei Lagen von Whatman 3MM Papier gelegt, das von einer erhöhten Plattform an den Seiten in eine Wanne mit 20xSSC (3M NaCl, 0.3M Na-Citrat) ragt. Auf das Gel wurden dann ein Nitrocellulosefilter derselben Größe, zwei Whatmann 3MM Lagen, sowie ein Stapel Filterpapier gelegt. Übernacht saugt das Filterpapier SSC durch das Gel und transferiert dabei die DNA an die Nitrocellulose. Nach dem Waschen des Filters für 30min in 2xSSC wurde die DNA durch Backen bei 80°C für 2h an das Filter gebunden (Southern, 1975).

10.3. Northern Blot

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1% Agarose-Gelen mit Formaldehyd (6.1%) in MOPS-Puffer (20mM Morpholinopropan sulfonsäure, 5mM Na-Acetat, 10mM EDTA, pH7.5). Als Molekulargewichts-Standard wurden dabei die mit isolierten, gut erkennbaren ribosomalen RNA's (28s bzw. 18s, 6333nt bzw. 2366nt) sowie E.coli ribosomale RNA (23s bzw 16s, 3566nt bzw 1776nt; Boehringer) verwendet (Rickwood und Hames, 1982).

10µg RNA in 2-5µl wurden vor dem Auftrag mit 10µl MOPS-Puffer 50% Formamid, 6% Formaldehyd bei 60°C für 30min denaturiert, mit 2µl Auftragspuffer (50% Glycerin, 1mM EDTA, 4% Bromphenolblau, 0.4% Xylencyanol) in die Geltaschen

gegeben und elektrophoretisiert, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 2/3 des Gels gewandert war.

Das Gel wurde dann auf eine Fluoreszenzplatte (Dünnschicht-Chromatographie Kieselgelplatte 60 F₂₅₄, Merck) gelegt und von oben mit UV-Licht bestrahlt, wobei durch das Nicht-Fluoreszieren des Kieselgels an den Stellen der ribosomalen Markerbanden eine Größenzuordnung erfolgt.

Der Transfer der RNA auf Nitrocellulose (Northern Blot) wurde analog dem Southern Blot mit dem unbehandelten Gel gemacht. Der Filter wurde danach nur getrocknet und bei 80°C für 2h gebacken (Thomas, 1980).

10.4. [³²P]-Markierung von DNA

Die Markierung der DNA erfolgte durch 'nick translation' mit dem System von NEN, Amersham. Dabei wurde 0.25µg DNA und 60µCi [³²P]-CTP sowie die von der Firma angegebenen Mengen an Substrat, Puffer und Enzymen für 2h bei 14°C inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 1µl 20% SDS wurden freie Nukleotide durch Gelfiltration über Bio-Gel A-1.5m (Bio-Rad) abgetrennt. Dazu wurde die Säule in einer silikonisierten Pasteur-Pipette gegossen, die unten mit etwas Glaswolle gestopft war. Das Gel wurde mit TEN-Puffer (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 100mM NaCl) äquilibriert und die Probe nach dem Auftrag mit jeweils 100µl TEN-Puffer fraktioniert. Nach dem Auszählen von 2µl Aliquots im Szintillationscounter wurden die Fraktionen des ersten Aktivitätsgipfels gesammelt und bei -20°C gelagert.

10.5. Hybridisierung von Southern Blots

Vor Zugabe der [³²P]-markierten DNA erfolgte eine Prähybridisierung des Filters mit 6xSSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt's Lösung (1mg Ficoll, 1mg Polyvinylpyrrolidon, 1mg Rinderserum Albumin pro ml; Denhardt, 1966) sowie 100µg/ml Kalbs-thymus-DNA, die 10min auf 100°C erhitzt worden war.

0.2ml Prähybridisierungs-Lösung/cm² Filter wurden bei 68°C für 4h inkubiert, danach wurden ca. 2/3 der Lösung entnommen und 10⁷cpm der radioaktiven DNA-Probe, die zuvor für 10min auf 100°C erhitzt worden war, zugegeben.

Nach 20h bei 68°C wurde der Filter bei RT 5min in 2xSSC, 0.5% SDS, einmal bei RT 15min in 2xSSC, 0.1% SDS und anschließend noch 90 min bei 68°C in 0.1xSSC, 0.5% SDS gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und mit einem Film (Kodak X-Omat S) bei -70°C und mit Verstärkerfolie exponiert.

10.6. Hybridisierung von Northern Blots

Analog zur Southern-Blot-Hybridisierung wurde der RNA Filter 4h bei 50°C prähybridisiert. Die Hybridisierungslösung bestand aus: 50% Formamid, 5xSSC, 250µg/ml hitze-denaturierter Kalbsthymus-DNA, 2x Denhardt's Lösung und 140mM Na-Phosphat-Puffer pH6.5. Nach Entnahme von ca. 2/3 der Flüssigkeit wurde die [³²P]-DNA zugegeben und 20h bei 50°C hybridisiert. Das Waschen bestand aus viermal 5min bei RT in 2xSSC, 0.1% SDS und zweimal 15min bei 68°C in 0.1xSSC, 0.1% SDS.

11. Computer Programme

Die gesamte EBV-DNA Sequenz mit 172.222nt wurde von der Gruppe um B.Barrell (Bear et al., 1984) sequenziert und stand zur Verfügung.

Berechnungen von Leseraster und Restriktionsenzym Schnittstellen wurden auf einer VAX 750 mit dem UWGCG Software Paket (Devereux et al., 1984) durchgeführt.

Das Programm für die Vorhersage von antigenen Bereichen wurde von B.Förtsch geschrieben und als Teil des UWGCG Software-Pakets für die VAX 750 implementiert. Es basiert im Prinzip auf den Parametern der Hydrophilizitätsberechnungen von Hopp und Woods (1981), sowie denen für Sekundärstrukturen von Chou und Fasman (1974a,b), und Argos et al. (1978).

C. Ergebnisse

1. Expression diagnostisch relevanter EBV-Proteine in *Escherichia coli*

1.1. Frühes Antigen p138

Aufgrund der in Abb.1 gezeigten Analysen von NPC-Seren wurde dieses Protein als diagnostisch relevant eingeordnet. Es handelt sich dabei um ein Antigen, das in der frühen Phase der lytischen Infektion in großen Mengen produziert wird (Bayliss und Wolf, 1981, Pearson, 1985) und wahrscheinlich bei der Replikation des viralen Genoms eine Rolle spielt. Es wird auch als 'major DNA-binding protein' bezeichnet und kann sich unspezifisch an Einzel- und Doppelstrang-DNA anlagern (Roubal et al., 1981; Sugawara et al., 1982; B.Kallin, persönliche Mitteilung).

1.1.1. Lokalisation

Aufgrund von in vitro Translationsdaten mit hybrid-selektionierter mRNA war bekannt, daß sich der kodierende Bereich für das p138 im BamHI-A Fragment befindet (Seibl und Wolf, 1985). Die von B. Barrell (Baer et al, 1984) zur Verfügung gestellten Sequenzdaten erlauben die Identifizierung von drei großen, linkwärts gerichteten Leserahmen (Abb.3). Der größte, am rechten Ende des BamHI-A Fragments gelegene, erschien aufgrund des berechneten Molekulargewichts als der wahrscheinlichste (BALF2). Er kodiert für 1127 Aminosäuren mit einer Molekülgröße von 123.277.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der entsprechende Bereich von BamHI-A subkloniert (pUC635, Konstruktion siehe Abb.6) und als Probe bei der hybrid-selektionierten Translation von mRNA aus P3HR1 Zellen benutzt. Der Bereich dieses Subklons in der kodierenden Region ist auch in Abb.9 zu sehen. Die in vitro Translation ergab nach Immunpräzipitation mit NPC-Serum ein Protein mit 138kDa (Abb.4). Aufgrund dessen wurde dieser Leserahmen, BALF2, (Baer et al. 1984) dem Protein p138 zugeordnet.

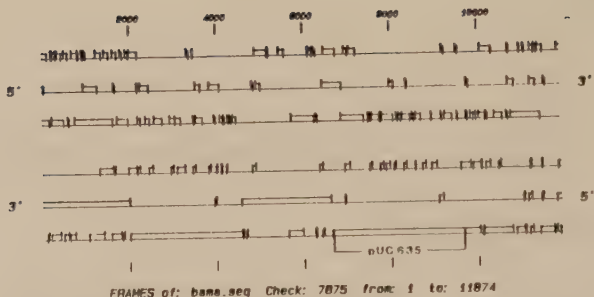


Abb. 3 Offene Leseraster Im BamHI-A Fragment

Die mit dem UWGCG Programm "Frames" erstellte Zeichnung stellt offene Leseraster in der Sequenz des BamHI-A Fragments in allen drei Leserastern sowie den beiden Orientierungen dar. Längenangaben in bp am oberen Rand. Im oberen Strang befinden sich in den drei möglichen Rastern keine größeren ORFs (offene Segmente); im unteren hingegen gibt es davon mehrere. Die Lokalisation der Insertion von pUC635 im linken ORF (BALF2) von BamHI-A ist angegeben. Dieser Raster erscheint aufgrund seiner Größe als geeignet, p138 zu kodieren.

Abb.4 Hybrid-selektionierte in vitro Translation.

Autoradiogramm eines 10%-SDS PA-Gels mit [35 S]-markierten Proteinen nach in vitro Translation mit gesamt P3HR1 RNA und pUC635-selektioniertem Transkript.

Rechte Spur: pUC635 hybrid-selektionierte mRNA
Linke Spur: gesamt-mRNA als Kontrolle.



1.1.2. Expression eines p138-Segments in E.coli-Minizellen

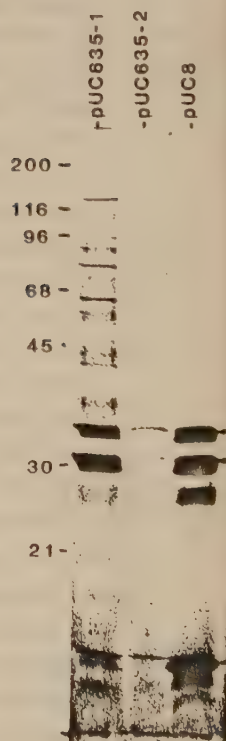
Zu Beginn wurde versucht, nahezu den gesamten p138-kodierenden Bereich oder große Segmente daraus zu produzieren. pUC635, das als Probe für die Lokalisation von p138 diente, enthält als kodierende Region ein 3.0kb-XhoI Fragment von Aminosäure 107 bis 1125, zwei Codons vor dem Translationsstop (Abb.9). Das Konstruktionsschema ist in Abb.6 gezeigt. Das XhoI-Fragment wurde in pUC8, linearisiert mit Sall, integriert. Der Leseraster dieser Insertion stimmt am 5' und 3' Ende mit dem pUC8 kodierten lacZ α -Raster überein. Das resultierende Produkt ist ein Fusionsprotein mit 10 Aminosäuren des N-Terminus von lacZ und Polylinker sowie dem lacZ α -Segment am C-Terminus. Nach Induktion des lacUV5-Promotors mit IPTG, SDS-PAGE der Bakterienlysate und Anfärbung mit Coomassie-Blau war keine zusätzliche Proteinbande zu entdecken. Auch durch [35 S]-Markierung während der Induktion und Immunpräzipitation der bakteriellen Lysate mit dem NPC-Serum-Pool konnte nach SDS-PAGE und Autoradiographie kein EBV-spezifisches Produkt nachgewiesen werden.

Um einen sensitiveren Nachweis führen zu können, wurde als weiterer Versuch die Expression in Minizellen versucht. E.coli Stamm DS410 ist eine Teilungsmutante, die nicht mehr zwei gleich große Tochterzellen produziert, sondern nur noch eine kleine Kugel am Ende abschnürt. Diese Minizellen haben ein zu geringes Volumen, um das bakterielle Chromosom aufzunehmen, besitzen aber noch die normale Enzymausstattung. Wenn dieser Minizell-produzierende Stamm mit einem Plasmid transformiert worden ist, wird dieses auch auf die Minizellen verteilt und stellt dann das einzige Template für eine Neutranskription und -translation in diesen Zellen dar. Aufgrund dessen ist es möglich, nach [35 S]-Methionin Markierung plasmid-kodierte Translationsprodukte frei von bakteriellem Hintergrund zu erkennen.

Das Plasmid pUC635 wurde in den Minizell-produzierenden Stamm DS410 gebracht. Durch mehrmaliges Zentrifugieren durch Saccharose-Kissen wurden die Minizellen aufgrund ihrer geringeren Größe isoliert, mit [35 S]-Methionin markiert, lysiert und durch SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert (Abb.5). Bei allen getesteten Klonen sind in der Region um 30kDa zwei deutliche Banden zu erkennen, die die Plasmid-kodierte β -Lactamase (30kDa) sowie deren Vorform mit dem Signalpeptid (32kDa) darstellen. Zusätzlich ist in der pUC8-Spur bei ca. 11kDa das α -Peptid zu finden. Bei den beiden Klonen mit pUC635 ist eine Bande im Bereich von 130kDa zu sehen, die dem gesuchten Expressionsprodukt

entspricht und aus dem 1020 aa p138-Segment und dem 11kDa α -Peptid besteht. Die zusätzlich auftretenden, kleineren Banden lassen den Schluß zu, daß die Stabilität des Expressionsproduktes nicht besonders gut ist, und es durch bakterielle Proteasen degradiert wird. Es kann aber zumindest der Nachweis erbracht werden, daß im richtigen Leserahmen kloniert worden war, und ein Expressionsprodukt entsteht.

Abb. 5 Autoradiogramm von [35 S]-Methionin-marklierten DS410-Minizellen Molekulargewichte am linken Rand in kDa. pUC635-1 und pUC635-2 sind zwei verschiedene Minizell-Präparationen. Bei pUC8 (Kontrolle) ist im Bereich von ca. 11kDa deutlich das lacZ-kodier- te α -Peptid zu erkennen. pUC635 kodiert für ein Produkt mit einem Molekular- gewicht von 130kDa, daneben ist noch eine Vielzahl kleinerer Banden zu erkennen. Die beiden starken Banden im Bereich von 30kDa stellen die Vektor-kodierte β -Laktamase sowie deren intrazellulären Vorläufer mit der Prä-Sequenz dar.



1.1.3. Expression großer p138-Segmente

Drei zusätzliche Expressionsplasmide mit großen p138-kodierenden Inserts wurden konstruiert: pUC924, pMF1 und pKK378. Als Ausgangsvektor diente dabei pUC9 für pUC924, pMF1 (Amann et al., 1983) für pMF924 und pKK240-11 (Amann und Brosius, 1985) für pKK378. Die beiden letzteren besitzen tac-Promotoren, pMF1 zusätzlich noch einen Teil des Lambda-Phagen cI-Repressorgens 5' von der Integrationsstelle für das p138 Genfragment. Das Konstruktionsschema für diese Plasmide ist in Abb.6 gezeigt. Das EBV BamHI-A Fragment wurde partiell mit XhoI verdaut; eine 3.3kb-Bande nach Gelelektrophorese isoliert und in die Sall-Stelle von pUC8 integriert. Diese 3.3kb Bande entspricht der Sequenz von Aminosäure 107 des p138 bis zu einer XhoI-Stelle, die 250bp 3' des Stopsignals von p138 liegt. (Und damit auch ca. 150 bp 3' der XhoI-Stelle, die für die Konstruktion von pUC635 verwendet wurde.)

Ein daraus resultierendes Plasmid (pUC6130), das das EBV-Insert in (-) Orientierung relativ zum lacUV5-Promotor besitzt, wurde mit EcoRI und BamHI linearisiert und ein 360bp-EcoRI/BamHI Fragment von pBR322 integriert. Diese Prozedur hat zur Folge, daß das EBV-Insert nun mit einem HindIII-Schnitt isoliert werden kann, denn mit auf dem kleinen pBR322-Fragment sitzt noch eine HindIII-

Erkennungsstelle. Das mit HindIII isolierte EBV-pBR322 Fragment wurde anschließend in den Vektor pKK240-11 inseriert, der unmittelbar nach dem Translationsstart hinter dem tac-Promotor eine HindIII-Stelle besitzt (pKK378).

Das p138-Fragment ist nun im richtigen Leserahmen: es sollte ein Produkt von Aminosäure 107 bis zum p138-Translationsstop entstehen.

Für die Konstruktion von pUC924 wurde das Plasmid pUC6130 mit BglII/EcoRI verdaut, ein 2.6kb-Fragment isoliert und in pUC9, linearisiert mit EcoRI und BamHI, integriert. Das resultierende Plasmid, pUC924, enthält die p138 Sequenz von Aminosäure 334 bis zum Translationsstop.

Von diesem Plasmid, pUC924, wurde durch einen BamHI/HindIII Verdau wiederum das p138-Segment isoliert und in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pMF1 C-terminal des cI-Repressor-Gens integriert (pMF924). Das resultierende Produkt kodiert für ein Fusionsprotein mit dem p138-Anteil von Aminosäure 334 bis zum Translationsstop, fusioniert mit seinem N-Terminus an den cI-Repressorproteinteil von pMF1.

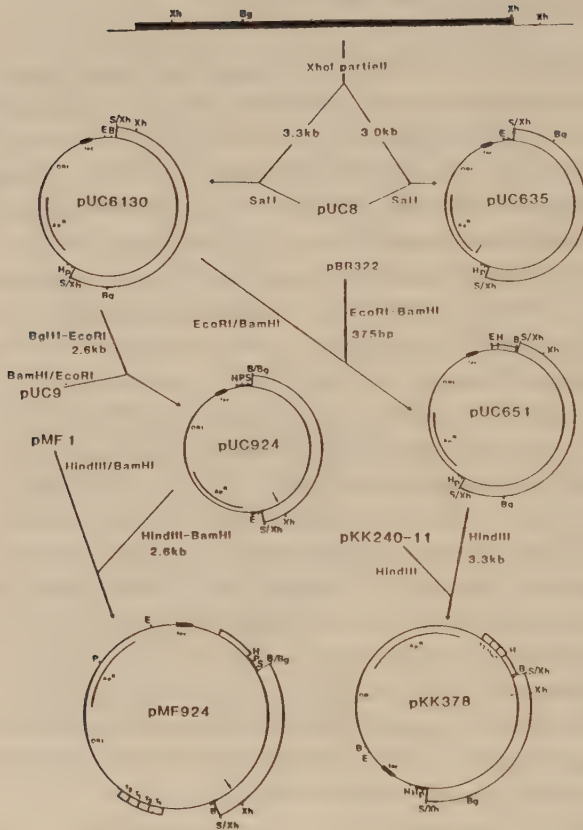


Abb.6 Konstruktion von Expressionsvektoren mit großen p138-Segmenten. Im oberen Teil die kodierende Region für p138 (dunkler Balken) mit den für die Konstruktion benutzten Restriktionsenzym-Schnittstellen. Nach partiellem XhoI-Verdau ergibt die Ligation der 3.0kb-Bande mit pUC8 das Plasmid pUC635. Von pUC6130, das das 3.3kb-Fragment mit dem EBV-kodierten Translationsstop in (-) Orientierung trägt, stammen Insertionen von pUC924, pMF924 und pKK 240-11. Abkürzungen wie Abb. 2; und Xh, XhoI; Bg, BglII; S, SalI; B, BamII; H, HindIII; E, EcoRI; P, PstI; offenes Segment, BamIII-A Sequenzen; dünnes offenes Segment, pBR322 Sequenzen von EcoRI (0) bis BamIII (375) mit der HindIII-Stelle (29). T1, T2, 5S bei pMF924 und pKK378 bezeichnen bakterielle Transkriptions-Terminatoren. Zusätzlich ist bei den vier Expressionsplasmiden mit einem Pfeil der jeweilige Translationsstop der mRNA angezeigt.

Diese Konstrukte wurden zusammen mit pUC635 auf Expression von p138-Antigen getestet. Da eine Minizell-Präparation mit den jetzt vier Plasmiden zu aufwendig erschien, wurde der Nachweis durch Transfer der bakteriellen Proteine auf Nitrocellulose und anschließendem Nachweis mit spezifischen anti-EBV Antikörpern geführt (Abb.7).

Dies gelang bei allen Konstrukten, jeder Klon produziert ein p138 Segment in dem erwarteten Molekulargewichts-Bereich, allerdings in sehr unterschiedlichen Mengen. Das von pUC635-kodierte Produkt liegt wie bei dem Minizell-Expressionsversuch im Bereich von 130kDa, das pKK378-kodierte Protein, das dasselbe p138 Fragment trägt, aber nicht an das pUC-kodierte lacZ α Protein fusioniert ist, hat ein um ca. 10kDa verringertes Molekulargewicht. Bei pUC924 und pMF924 ist eine ähnliche Molekulargewichts-Verschiebung zu beobachten. Beide besitzen das p138-Fragment von Aminosäure 334 bis zum Translationsstop; pUC924 jedoch als nicht-fusionierten ORF (abgesehen von einigen pUC-kodierten Aminosäuren des Polylinkers am N-Terminus), das Expressionsprodukt hat ein Molekulargewicht von etwa 80kDa. Bei pMF924 mit demselben p138-Fragment, aber fusioniert mit dem N-terminalen Teil des cI-Repressorproteins (17kDa), ergibt sich ein Molekulargewicht von ca. 97kDa.

Die Menge der Expressionsprodukte der verschiedenen Plasmide variiert über einen weiten Bereich. Die beiden Proteine mit bakteriellen Fusionsanteilen werden in erheblich größerem Maß synthetisiert als die entsprechenden nicht-Fusionsproteine. Offensichtlich stabilisieren die bakteriellen Anteile die eukaryotischen Proteinfragmente. Die Menge des am besten exprimierten Produkts von pUC635 erscheint aber viel zu gering, um eine präparative Reinigung für diagnostische Zwecke zu versuchen; im Coomassie-blau gefärbten Gel war das Protein nur als schwache Bande zu erkennen.

Es ist nicht zu erwarten, daß durch andere Konstrukte oder Verwendung von anderen Promotoren die Expressionsausbeute wesentlich gesteigert werden kann, denn die Größe eukaryotischer Proteine scheint der limitierende Faktor bei der Expression in *E.coli* zu sein.

Aus diesem Grund wurde ein anderer Weg eingeschlagen, um das p138-Antigen zu produzieren.

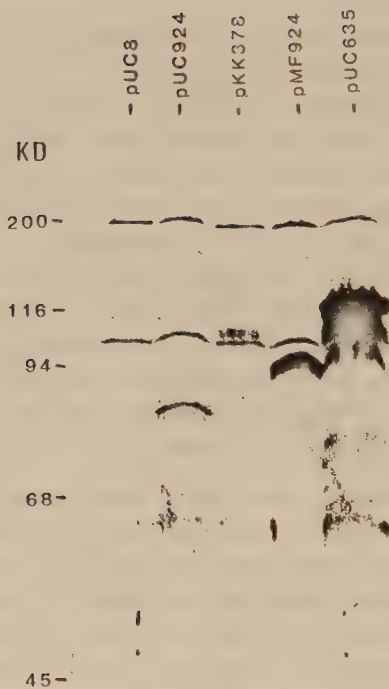


Abb.7 Expression großer p138-Segmente und Nachweis antigener Reaktion. 10%-SDS PA Gel mit den angezeigten JM109-Klonen (pUC8 als Kontrolle) und anschließendem Proteintransfer auf Nitrocellulose. Nach Inkubation mit NPC-Serum-Pool erfolgte der Nachweis von gebundenem IgG mit Peroxidase-gekoppeltem Kaninchen anti-human-IgG und Färbe-Reaktion. Menschliche Seren zeigen deutliche Reaktionen gegen E.coli-Proteine.

1.1.4. Vorhersage antigener Bereiche in der Primärstruktur von p138 aufgrund von Hydrophilizitäts- und Sekundärstrukturberechnung.

Für die geplante Verwendung des p138-Expressionsprodukts im ELISA erscheint es uninteressant, ob das gesamte Protein zur Verfügung steht oder nur die haupt-immunogenen Bereiche, da nur diese für die Antikörper-Reaktion benötigt werden. Deswegen wurde versucht, kleinere, antigene Segmente von p138 zu exprimieren, die eine höhere Produktion in den E.coli-Zellen erlauben sollten.

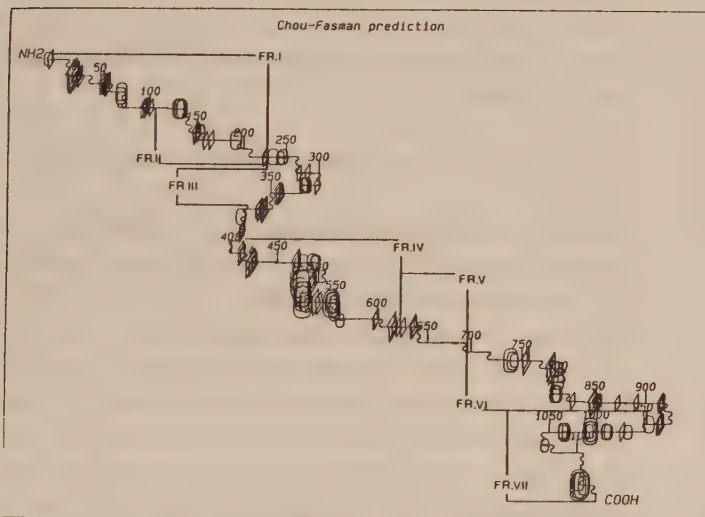


Abb.8 Computer-Plot der berechneten Sekundärstruktur der p138-Aminosäuresequenz mit hydrophoben (Rauten) und hydrophilen (Kreise) Regionen. Aufgrund der gezeigten Vergrößerung lassen sich von den Sekundärstrukturen (α -Helices, β -Faltblatt) nur β -turns als Drehungen um 180° erkennen. Stark hydrophile β -turn Bereiche befinden sich zwischen aa 520-550 und am C-Terminus. NH_2 bzw. COOH , N- bzw. C-Terminus, Nummerierung alle 50aa; FR.I bis FR.VII bezeichnen DNA-Fragmente, welche die markierten p138-Segmente kodieren und für Subklonierungen verwendet wurden.

Die Lokalisation möglicher immunogener Regionen wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes gemacht, das Hydrophilizitätswerte (Hopp und Woods, 1981) mit der Chou-Fasman Berechnung der Sekundärstruktur (Chou und Fasman, 1974a, b; Argos et al., 1978) kombinierte und in einem zweiten Schritt aus diesen Daten eine Graphik erstellte. Bei der Auswertung dieser Graphik wurde davon ausgegangen, daß Bereiche des Proteins dann besonders gut von Antikörpern erkannt werden, wenn sie an der Oberfläche (hydrophil) liegen und gleichzeitig β -turn Struktur aufweisen. Diese Bereiche sollten aus der Oberfläche des Proteins herausragen und (auch aufgrund ihrer Flexibilität) bevorzugt Erkennungsstellen für das Immunsystem abgeben.

Abb.8 stellt die berechnete Chou-Fasman Sekundärstruktur von p138 mit hydrophoben bzw hydrophilen Bereichen dar. Deutlich lassen sich sehr hydrophile β -turn Strukturen im Bereich von Aminosäuren 520-550 und am C-Terminus ausmachen. Diese Bereiche erschienen als geeignete Kandidaten für die Expression von p138-Segmenten in *E. coli*.

1.1.5. Überprüfung der Vorhersage von antigenen Bereichen

Zu diesem Zweck erfolgte die Subklonierung der gesamten p138-kodierenden Sequenz in Fragmente zwischen 220 und 750bp. Die den jeweiligen Proteinsegmenten entsprechenden DNA-Fragmente sind in Abb.8 gezeigt und mit FR.I bis FR.VII bezeichnet. Diese DNA-Stücke wurden an das 3' Ende des lacZ Gens von pUR-Vektoren (Rüther und Müller-Hill, 1983; Abb.2) fusioniert, als β -Gal Fusionsproteine exprimiert und auf ihre Reaktivität mit NPC-Serum getestet. β -Gal Fusionsproteine wurden deshalb gewählt, da die kleinen p138-Segmente in den *E.coli*-Zellen nach ihrer Synthese wahrscheinlich nicht stabil bleiben, sondern abgebaut werden. Der große, 116kDa β -Gal Anteil ist in der Lage diese eukaryotischen Proteinsegmente stabil zu halten.

BamIII-A in pBR322 wurde mit HgiAI und PstI verdaut, das als FR.I (Abb.8, Abb.9) bezeichnete 716bp-Fragment isoliert und in die PstI-Stelle von pUC9 integriert (pUC1P). Die HgiAI Erkennungssequenz besitzt dasselbe "sticky end" wie PstI.

pUC635 wurde mit PstI verdaut, die 3.3kb-Bande eluiert und religiert. Der resultierende Vektor besteht nun aus pUC8 sowie der p138-Sequenz von der ersten XhoI-Stelle bis zur selben PstI-Stelle, die für die Konstruktion von pUC1P benutzt wurde. Der daraus resultierende Klon mit FR.II wurde pUCP400 bezeichnet. Der Verdau von pUC635 mit PstI ergibt zusätzlich noch sechs Fragmente, wobei von den dazu nötigen sieben PstI-Erkennungsstellen sechs in

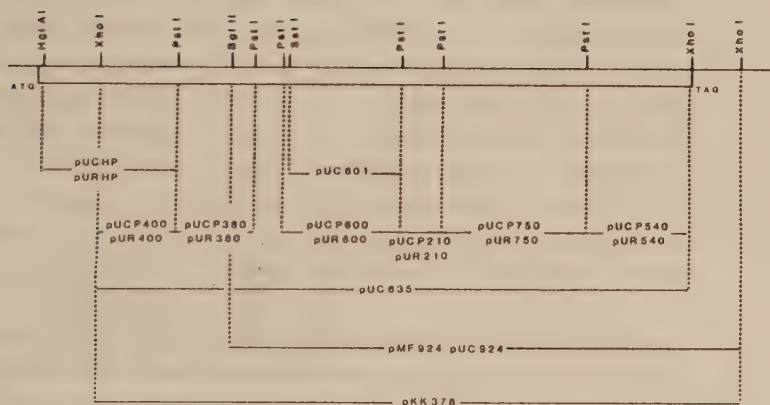


Abb.9 Übersicht der p138-Expressionsplasmide und Lokalisation ihrer Insertion auf der kodierenden Region.

Das offene Segment stellt die p138-kodierende Region mit den für Subklonierungen benutzten Enzymen dar (Hg, HgiAI; X, XhoI; P, PstI; Bg, BglII), ATG und TAG bezeichnen Start bzw. Ende der Translation.

Im unteren Bereich sind die kodierenden Bereiche der Subklone dargestellt.

der p138-kodierenden Sequenz zu finden sind, und eine aus dem Polylinker von pUC8 bzw. pUC635 stammt. Von den sechs PstI-Fragmenten wurden fünf in pUC inseriert, ein kleines 170bp-Stück, das für den Bereich um aa400 kodiert, wurde nicht verwendet. Die Ligationen ergaben folgende Klone: FR.III, 380 bp, pUCP380; FR.IV, 607 bp, pUCP600; FR.V, 210 bp, pUCP210; FR.VI, 755 bp, pUCP750; FR.VII, 535 bp, pUCP540 (Abb.8, Abb.9).

Von diesen Klonen, mit Ausnahme von pUCHP, wurden die p138-Subfragmente nach BamHI/HindIII-Verdau isoliert und in die entsprechenden Stellen des Polylinkers am 3'-Ende des lacZ-Gens von pUR288 integriert.

Das DNA-Fragment von pUCHP mit dem Start des p138-Gens wurde als EcoRI/HindIII-Stück isoliert und in die entsprechenden Stellen des Plasmids pINIIIA1 (Masui et al, 1984) integriert. Durch diese Prozedur wurde eine zweite BamHI-Stelle (neben einer, die vom pUC9 Vektor stammt) unmittelbar neben die HindIII-Stelle gebracht. pINIIIA1 besitzt einen Polylinker mit den Schnittstellen EcoRI-HindIII-BamHI. Von einem resultierenden Klon wurde das p138-Fragment als BamHI-Stück isoliert und in pUR289 integriert.

Die aus diesen Schritten erhaltenen pUR-Klone erhielten Namen analog zu den vorhergehenden pUC-Klonen d.h. FR.I, pURHP; FR.II, pUR400; FR.III, pUR380; FR.IV, pUR600; FR.V, pUR210; FR.VI, pUR750; FR.VII, pUR540 (Abb.9).

Nach Induktion mit IPTG exprimieren alle pUR-Klone Fusionsproteine mit den jeweiligen p138-Anteilen, wobei die Molekulargewichte mit der Insertgröße in etwa korrelieren (Abb.10). Daneben treten zusätzlich kleinere Banden auf, die die Größe von β -Gal (116kDa) besitzen. Dabei dürfte es sich entweder um unvollständige Translation oder um Degradationsprodukte handeln.

Ebenfalls in Abb.10 sind dieselben bakteriellen Lysate nach Western Blot und Immunfärbung mit NPC-Serum gezeigt. Wie in der Computergraphik angedeutet, werden zwei Bereiche von p138 als Haupt-Immunogene erkannt. Der Bereich um Aminosäure 520-540 und in noch viel stärkerem Ausmaß das Segment vom C-Terminus (FR.VII) zeigen als einzige eine antigene Reaktion.

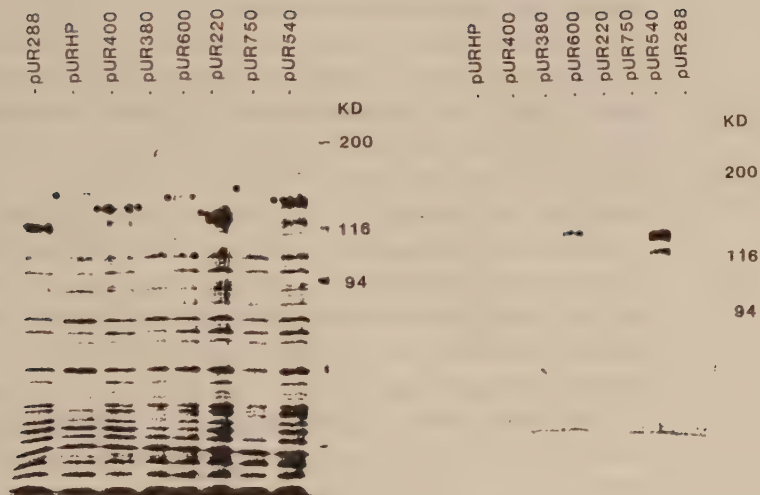


Abb.10 Expression von p138-Segmenten als β -Gal Fusionsproteine und Identifizierung von haupt-immunogenen Bereichen.

Links: Coomassie-blau gefärbtes 10%-SDS PAGE mit Lysaten der angezeigten Klone nach Induktion mit IPTG. Lokalisation der Insertionen in der p138-kodierenden Region siehe Abb. 8 und 9 (pUR288 als negative Kontrolle).

Rechts: Immunfärbung mit NPC-Serum-Pool derselben Proben nach SDS-PAGE und Western Blot. Starke Reaktion treten bei den Fusionsproteinen mit den Insertionen FR.IV (pUR600) und FR.VII vom C-Terminus (pUR540) auf.

1.1.6. Expression von p138-Fragmenten in pUC-Vektoren als p138::lacZ α Fusionsproteine

Aufgrund von Reaktionen humaner Seren mit bakterieller β -Gal, auch bei vorheriger Absättigung des NPC-Serums (s. Abb.10), erscheint es nicht ratsam, diese Proteine für einen ELISA zu verwenden. Deswegen wurde versucht, ob und welche p138-Segmente als Fusionsproteine mit den kleinen 11kDa-lacZ α Peptid der pUC-Vektoren stabil exprimiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die schon beschriebenen pUC-Konstrukte verwendet, die bei den pUR-Plasmiden (s. 1.1.5) als Zwischenstufe dienten. Bei diesen Plasmiden stimmt der p138-kodierende Leserahmen am 3' und 5' Ende des jeweiligen Inserts mit dem des pUC-Vektors überein. Bei pUCHP ist der Übergang des ORF nur am 3'-Ende des Inserts korrekt.

Abb.11 zeigt im linken Teil das Coomassie-blau gefärbte SDS-PA Gel mit den Lysaten der IPTG-induzierten pUC-p138 Klone. Nur das von FR.IV-kodierte p138-Segment von pUCP600 ist als p138::lacZ Fusionsprotein stabil (32kDa). Bei allen anderen Lysaten ist keine zusätzliche Bande zu entdecken. Im immun-gefärbten Western Blot (Abb.11, rechter Teil) reagiert nur dieses Protein als EBV-spezifisches Antigen. Die Reaktion ist stärker als die des entsprechenden pUR600-Proteins, was darauf hindeutet, daß die Bindung von Antikörpern an das EBV-Epitop durch die große β -Gal bei pUR600 sterisch behindert sein könnte.

Da bei den anderen Konstrukten kein spezifisches Translationsprodukt zu finden war, wurde der Nachweis einer Expression indirekt durch Transformation der Plasmide in JM83 geführt. Dieser E.coli-Stamm zeigt neben der Deletion im N-terminalen Teil des chromosomalen lacZ-Gens keine lacI-Repressor Überproduktion. Dies hat zur Folge, daß die normale Repressorprotein-Menge nicht ausreicht, die Transkription von dem in hoher Kopienzahl vorliegenden Plasmid zu unterdrücken, und deswegen eine konstitutive Transkription von lac Promotoren stattfindet.

Die JM83-Klone mit den jeweiligen pUC-Konstrukten wurden auf X-Gal Platten ausplattiert. Die Kolonien zeigten alle (bis auf pUCHP) eine leicht blaue Farbe. Dies ist dadurch zu erklären, daß ein schwach aktives lacZ α -Protein entsteht, das noch in der Lage ist, mit dem chromosomal kodierten Teil der β -Gal eine α -Komplementation einzugehen, so daß ein aktives Enzym trotz des EBV Proteinanteils entsteht.

Die p138::lacZ Fusionskonstrukte werden also korrekt transkribiert und trans-

latiert, sind aber so instabil, daß sie sofort wieder degradiert werden. Es handelt sich hier um eukaryotische Proteinfragmente, die nicht in der Lage sind, eine Tertiärstruktur einzunehmen, die sie vor Proteasen schützen könnte. Der lacZ α -Fusionsanteil selbst ist höchst instabil. Es war nur in den Mini-zell-Experimenten (Abb.5) möglich, dieses Protein nachzuweisen.

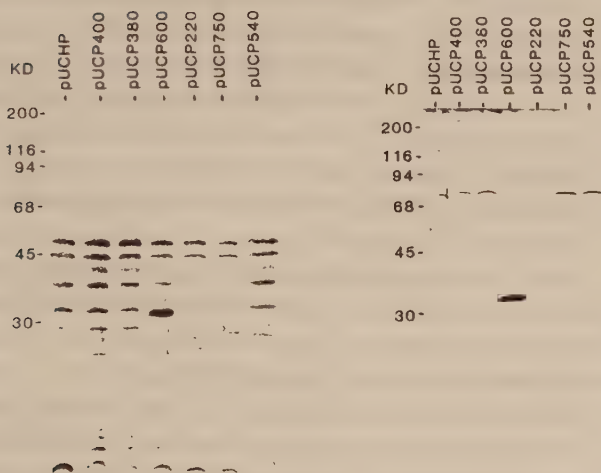


Abb.11 Expression von p138-Segmenten in pUC-Vektoren mit dem lacZ α -Peptid als Fusionsteil.

17.5%-SDS PA Gel nach Coomassie-blau Färbung (links) und nach Westernblot und Immunfärbung (rechts). Nur das von pUCP600-kodierte FR.IV-p138: lacZ α Protein bleibt nach Synthese stabil und zeigt eine starke antigene Reaktion. Die Expressionsausbeute des p138-Segments in pUCP600 kann auf ca. 10% des Gesamtproteins geschätzt werden.

1.1.7. Fusion der beiden p138-Immunogene und Insertion eines Oligonukleotids

Da aufgrund der Expression in den pUR-Vektoren zwei immunogene Regionen von p138 gefunden wurden, aber nur FR.IV ein stabiles Produkt kodiert, wurden beide Fragmente fusioniert, um ein Produkt zu bekommen, das alle Antikörper-Reaktionen abdeckt. Zusätzlich wurde am 5'-Ende des Fusionsfragments ein Oligonukleotid integriert, das für fünf Argininreste sowie zwei Translations-stop Codons kodiert. Dies verhindert einmal den Einbau bakterieller β -Gal Anteile des pUC-Vektors; zum zweiten sollten die entstehenden C-terminalen Argininreste bei der Aufreinigung des Produktes hilfreich sein. (Sassenfeld und Brewer, 1984; Smith et al., 1984)

Abb.12 zeigt das Konstruktionschema für dieses Fusionsprotein. FR.IV wurde aus pUCP600 als SstI/HindIII-Fragment isoliert und in pUC12 integriert. Auf diese Weise wurde die 3'-PstI-Stelle eliminiert. SstI schneidet in FR.IV 25bp nach PstI, in dem resultierenden Klon pUC601 stimmt der Leserahmen mit dem pUC-lacZ wieder am 5'- und 3'-Ende. Im nächsten Schritt wurde pUC601 mit PstI und HindIII geöffnet, und das in Abb.12 gezeigte Oligonukleotid als ss-DNA (unterer Strang) integriert. Das Oligonukleotid wurde von R.Merz, Institut für Biochemie, München, synthetisiert und weist an den Enden die vier Basen der 'sticky ends' von PstI bzw. HindIII auf.

Das 29nt lange Fragment wurde nach der Synthese auf einem 20% Acrylamid/8M Harnstoff Gel aufgetrennt und nach dem Sichtbarmachen durch UV-Licht und Fluoreszenzplatte (siehe Methoden, RNA-Gele) ausgeschnitten. Eluiert wurde das Oligo-nt durch Auszentrifugieren aus einer 1ml Eppendorf-Spitze mit zweimal 0.5ml Wasser. Nach dem Fällern mit Ethanol und Waschen erfolgte eine Phosphorylierung mit 5 Einheiten T4-Polynukleotidkinase (Biolabs) und 1mM ATP für 45min bei 37°C. Anschließend wurde das Fragment in pUC601, linearisiert mit PstI und HindIII, eingesetzt. Das Oligonukleotid sollte aufgrund seiner 'sticky ends' mit dem 3'-überstehenden Ende von PstI bzw. dem 5'-überstehenden von HindIII in das Plasmid eingebaut werden. Die resultierende Lücke im Doppelstrang wird nach der Transformation in JM109 durch die zelluläre DNA-Polymerase geschlossen. Das Testen von Klonen mit der Oligo-nt Insertion wurde durch Verdau der Plasmide mit PvuII/PstI bzw. PvuII/HindIII durchgeführt. PvuII schneidet 90 bzw 120bp 5' und 3' der multiplen Klonierungsstelle der pUC-Plasmide. Durch einen zusätzlichen PstI- bzw. HindIII-Schnitt war es möglich, Unterschiede von 29nt zu erkennen. Ein positiver Klon (pUCARG601),

der für die weitere Konstruktion verwendet wurde, wurde zusätzlich noch einer Sequenzanalyse unterzogen. Für diesen Zweck wurde die Insertion mit dem Oligonukleotid als EcoRI/HindIII-Fragment isoliert und in den Einzelstrang-Phagen m13mp8 integriert.

Von dem rekombinanten Phagen wurde die Einzelstrang-DNA isoliert und die Insertion nach der Methode von Sanger (1977) von P.Heinrich, Institut für Biochemie, München, sequenziert. Die Sequenzdaten (nicht gezeigt) ergaben das erwartete Bild: das Oligonukleotid war richtig und vollständig eingebaut worden, der Leserahmen für die fünf Argininreste und zwei Stopcodons stimmte mit dem p138-kodierenden Fragment überein.

In einem letzten Schritt wurde nun noch FR.VII, das den zweiten immunogenen Bereich aus p138 kodiert, eingebaut. Das Plasmid pUCARG601 wurde dazu mit PstI linearisiert und FR.VII als PstI-Fragment von pUCP540 integriert. Das resultierende Plasmid pUCARG1140 enthält nun die kodierenden Sequenzen von p138 mit den beiden immunogenen Bereichen, gefolgt von fünf Argininresten und zwei Stopcodons.

Es wurde noch versucht, dieses Fusionskonstrukt zu verkleinern. Auf den Fragmenten FR.IV und FR.VII liegt jeweils eine NcoI-Schnittstelle. pUCARG1140 wurde mit diesem Enzym verdaut und religiert. Das resultierende Konstrukt pUCARGNCO enthält von FR.IV noch 123 Aminosäuren (von 195 in pUC601) und FR.VII liegt jetzt in einem falschen Leserahmen, der nach sieben Aminosäuren einen Stopcodon aufweist. Um wieder in den FR.VII-Leserahmen zu gelangen, wurde pUCARGNCO mit NcoI wieder linearisiert, kurzzeitig mit S1 Nuklease verdaut und religiert. Die entstandenen Klone wurden auf die Größe ihrer Expressionsprodukte im Coomassie-blau gefärbten SDS-PA Gel getestet. Ein Plasmid, pUCARG680, kodierte dabei für ein Protein mit ca. 28kDa (Abb.13) was das Indiz für die Translation des FR.VII-Anteils war und bedeutet, daß die Leserahmen von FR.IV und FR.VII wieder übereinstimmen.

Für ein weiteres Konstrukt wurde schließlich noch pUCARG601 mit ScaI und EcoRI verdaut und in pUC8 integriert. Da ScaI einen 'blunt end'-Schnitt setzt, wurde das Fragment in pUC8 integriert, bei dem die BamHI-Stelle durch Klenow-Polymerase aufgefüllt worden war. Aufgrund dieser Prozedur entstand in dem resultierenden Klon, pMF175, unmittelbar nach der FR.IV-Sequenz ein Stopcodon, da die Sequenz jetzt wie folgt lautet:

----CAG T/GA TCC-----

FR.IV BamHI/Klenow

Dieses Konstrukt stammt von M.Bröcker, Behring Werke, Marburg, und kodiert noch für 169 Aminosäuren (von 195 in pUC601, und 123 in pUC ARGNCO). Abb.12 gibt einen Überblick über die geschilderten Konstruktionen. Die Expression von EBV-spezifischen Proteinen ist in Abb.13 gezeigt.

pUCP600 exprimiert das schon in Abb.11 gezeigte Produkt mit ca 32kDa, das aus dem 21kDa-Anteil des FR.IV-kodierten p138-Segments sowie dem 11kDa-lacZ α besteht. Bei pUC601 wurde ein Teil des pUC-Polylinkers (von SstI bis PstI) sowie ein 25bp-Fragment von FR.IV (bis zur SstI-Stelle) entfernt. Das daraus resultierende Translationsprodukt ist demzufolge um 15aa kleiner, was sich in einem etwas verringerten Molekulargewicht ausdrückt.

Bei pUCARG601 wurde das Oligo-nt mit den Translationsstops eingebaut. Als Folge davon wird das lacZ α -Peptid nicht mehr translatiert, die Molekülgröße nimmt um 11kDa ab. (Die Stabilität des Proteins ist der Beweis, daß das lacZ α -Peptid nichts mit der Stabilisierung zu tun hatte.)

Nach der Insertion von FR.VII bei pUCARG1140 steigt das Molekulargewicht des Expressionsprodukts auf ca. 43kDa, was bedeutet, daß die zweite antigene Determinante, kodiert von FR.VII, korrekt translatiert und terminiert wird.

Bei pUCARGNCO sinkt das Molekulargewicht auf 15kDa, da hier nur 130aa von FR.IV translatiert werden. Aufgrund des falschen Übergangs zu dem verkürzten FR.VII-Fragment wird nach 7 Aminosäuren terminiert. Obwohl von FR.IV nur noch ca 2/3 translatiert werden, ist das Protein überraschenderweise immer noch stabil.

Bei pUCARG680 steigt das Molekulargewicht wiederum auf ca. 28kDa, da der Übergang zum verbleibenden FR.VII-Anteil wieder stimmt.

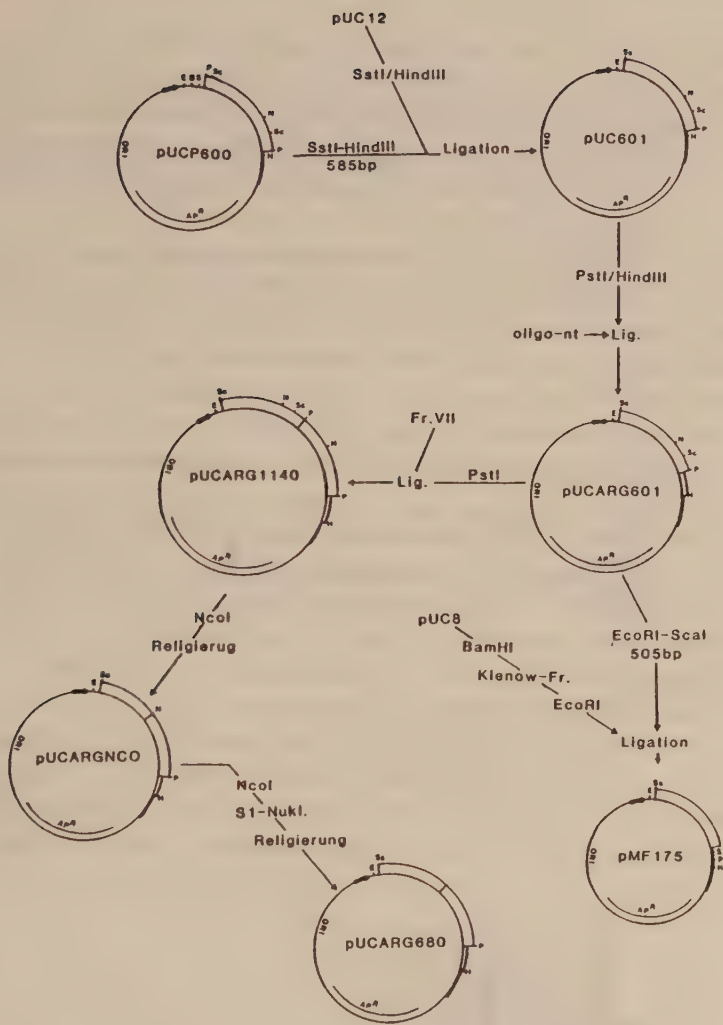
Bei pMF175 schließlich entsteht ein Produkt mit ca. 24kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht entspricht, da nur 175aa-Codons von FR.IV translatiert werden.

Ebenfalls in Abb.13 ist die Immunogenität der beschriebenen Expressionsprodukte gezeigt.

Die Verkürzung bei pUC601, d.h. das Fehlen der ersten 25bp von FR.IV hat keinen Einfluß auf die Reaktivität des Expressionsproduktes, ebensowenig wie das Fehlen des lacZ α -Peptids bei pUCARG601.

Ob sich durch das Hinzufügen der zweiten antigenen Region in pUCARG1140 eine Steigerung der Antigenität ergibt, läßt sich in diesem Ansatz nicht beantworten, auf jeden Fall reagiert das Produkt stark positiv.

Bei dem kleinen Peptid, kodiert von pUCARGNCO, ist die Reaktivität nahezu verloren gegangen, dagegen ist das Produkt von pMF175 stark positiv, was eine Eingrenzung der hauptantigenen Komponente möglich macht (s. Diskussion).



(2)

PstI 5' 3' HindIII

G CGT CGT CGT CGT CGT TGA TA

AC GTC GCA GCA GCA GCA ACT ATT CGA

Arg Arg Arg Arg Arg stop stop

Abb.12 Legende nächste Seite

Abb.12 Schema der Modifikationen bei pUCP600 und Fusion mit dem zweiten Immunogenen Bereich.

Die Sequenz des Oligonukleotids (unterer Strang), das in die PstI- und HindIII-Stelle von pUC601 eingesetzt wird, ist im unteren Teil dargestellt, im Schema als dünnes offenes Segment; große offene Segmente, p138-Sequenzen; starke Linien, pUC8-kodiertes lacZ ; Abkürzungen wie Abb.6 und Ss, SstI; N, NcoI; Sc, Scal.

ORF: pUCP600, FR.IV + lacZ ; pUC600, FR.IV + lacZ ; pUCARG601; FR.IV + Oligo-nt; pUCARG1140, FR.IV + FR.VII + Oligo-nt; pUCARGNCO, FR.IV verkürzt; pUCARG6 FR.IV verkürzt + FR.VII verkürzt + Oligo-nt; pMF175, FR.IV (bis zur Scal Stelle).

Abb.13. Expression und Antigennachweis von den in Abb.12 gezeigten Konstrukten.

Links: Coomassie-blau gefärbtes 17,5% SDS-PAGE mit den Lysaten der IPTG induzierten Klone. Plasmid-kodierte Expressionsprodukte sind mit Punkten markiert.

Rechts: Westernblot und NPC-Serum-Immunfärbung derselben Lysate. Größenangaben an den linken Rändern in kDa.



Da schon pUCARGNCO keine Antigenität mehr aufweist, ist das korrekte Zusammenfügen mit dem FR.VII-Teil (pUCARG680) kein Vorteil mehr. Das Protein reagiert auch nur unwesentlich besser als pUCARGNCO. Aus diesem Grund wurde das pUCARG1140-kodierte Epitop-Fusionsprotein als Ergebnis dieser Subklonierung für weitere Versuche verwendet.

1.1.8. Variabilität der Antikörperspezifität gegen die beiden p138-Epitope

Zwei individuelle Seren von NPC-Patienten wurden im Hinblick auf ihre Spezifität für die beiden antigenen Regionen untersucht. Für diesen Zweck wurden neben pUC8- und pUCARG1140-Lysaten die Proteine von IPTG-induzierten Bakterien mit pUR540 und pUR600 aufgetrennt und die Reaktivität nach einem Western Blot mit den IgG- bzw. IgA-Antikörpern der beiden NPC Patienten untersucht.

Das Ergebnis ist in Abb.14 gezeigt. Bei NPC-Serum No.372 ist der Großteil der p138-spezifischen Antikörper gegen das von FR.VII kodierte C-terminale Epitop in pUR540 gerichtet. Das gilt für die IgG-Antikörper und besonders für die der IgA-Klasse. Dagegen zeigt NPC Serum No.354 genau die umgekehrte Reaktion. Der Großteil der IgG- und IgA-Antikörper erkennen das von pUR600 kodierte Epitop (FR.IV) aus dem mittleren Bereich des Proteins. Wichtig ist jedoch, daß beide Seren, unabhängig von ihrer Spezifität für die beiden Epitope, immer das von pUCARG1140 kodierte Protein erkennen.

Diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit der Fusion der beiden antigenen Epitope, um für die angestrebten ELISAs ein Antigen zu bekommen, das die individuellen Spezifitätsunterschiede abdecken kann.

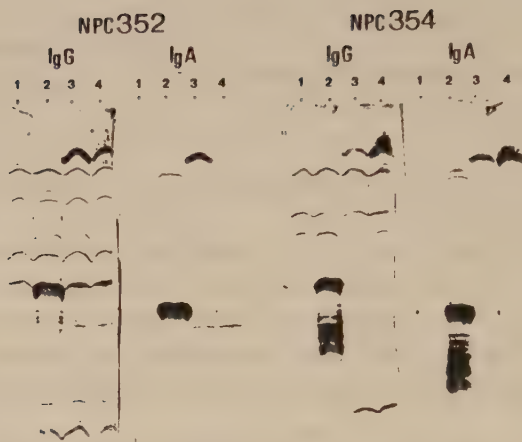


Abb.14 Variabilität der Immunantwort von NPC Patienten gegen die beiden p138- Hauptimmunogene.

Westernblot von Lysaten der IPTG-induzierten Klone und Nachweis von gebundenem IgG bzw. IgA der NPC-Seren Nr.352 und 354 mit Peroxidase-gekoppeltem Kaninchen anti-humanen IgG bzw. IgA und Färbereaktion.

- 1) pUR288 (neg. Kontrolle);
- 2) pUCARG1140 (pos. Kontrolle);
- 3) pUR540 (FR.VII);
- 4) pUR600 (FR.IV).

1.1.9. Versuche zur Reinigung des von pUCARG1140 kodierten Proteins

Der fusionierte Oligo-Argininanteil bei dem pUCARG1140-kodierten Produkt sollte eine zentrale Rolle bei der Reinigung des Proteins spielen (Sassenfeld und Brewer, 1984; Smith et al., 1984). Die Idee dabei war, daß aufgrund der hohen positiven Ladung durch die Argininreste am C-Terminus eine Anbindung an einen Kationenaustauscher (Sephadex SP C-25, Pharmacia) möglich sein mußte. Nach der Elution mit einem Salzgradienten sollte das Proteingemisch mit Carboxypeptidase B verdaut werden. Dieses Enzym entfernt spezifisch Arginin- und Lysinreste vom C-Terminus, so daß durch diesen Verdau die positive Ladung des Proteins spezifisch herabgesetzt wird. Kontaminierende bakterielle Proteine sollten in ihrer Nettoladung gleich bleiben, da es unwahrscheinlich ist, daß sie dieselbe Aminosäurenkombination am C-Terminus aufweisen. Bei einer darauf folgenden zweiten SP-Chromatographie sollten dann demzufolge die kontaminierenden Proteine bei der gleichen Salzkonzentration

abgelöst werden, während das EBV-Fusionsprotein aufgrund der jetzt fehlenden positiven Ladungen bei einer geringen Salzkonzentration eluiert wird.

Bei dem Versuch, diesem Reinigungsschema zu folgen, traten aber erhebliche Schwierigkeiten auf. Nach Induktion einer größeren Kultur dieses Klonen wurden die Bakterien pelletiert, in 20mM Tris, pH7.5, 0.5mg/ml Lysozym resuspendiert und nach 45-minütiger Inkubation und anschließender Zugabe von Triton X-100 (1%), 2x10min Ultraschall-behandelt. Bei der anschließenden Zentrifugation wurde nahezu das gesamte pUCARG1140-kodierte Protein im Pellet wiedergefunden. Diese Unlöslichkeit konnte nur durch Lösen in 8M Harnstoff überwunden werden. Während das Lösen in Harnstoff bei pH 7.0 problemlos ging, war es jedoch nahezu unmöglich das, Proteinpellet bei niedrigerem pH Wert zu lösen, der für die Anbindung des Proteins an die Kationen-Austauscher Säule nötig gewesen wäre.

Deshalb wurde eine Anreicherung mit Hilfe von DEAE-Chromatographie in 8M Harnstoff bei pH7.5 vorgenommen. Das pUCARG1140-kodierte Produkt bindet dabei sehr gut und wird erst bei einer NaCl-Konzentration von 0.5M abgelöst. Das EBV-Protein blieb bei einer anschließenden Dialyse gegen 20mM Tris-HCl, pH7.5 und 0.1% Triton X-100 in Lösung, wurde aber nach einem pH-Wechsel auf 4.5 sofort wieder unlöslich. Aus diesem Grund mußte das ursprünglich geplante Reinigungsschema aufgegeben werden.

Als zusätzliche Abtrennung von bakteriellen Proteinen wurden stattdessen die bakteriellen Lysate nach dem Aufbrechen noch mit Harnstoff in einer Endkonzentration von 4M versetzt, wodurch mehr Bakterienproteine gelöst wurden, während das EBV-Antigen in der Pelletfraktion zu finden war.

Durch Kombination von fraktioniertem Lösen in Harnstoff und DEAE-Chromatographie gelang schließlich eine Anreicherung bis zu ca. 80% (nicht gezeigt)

1.1.10. Überprüfung des Expressionsprodukts von pUCARG1140

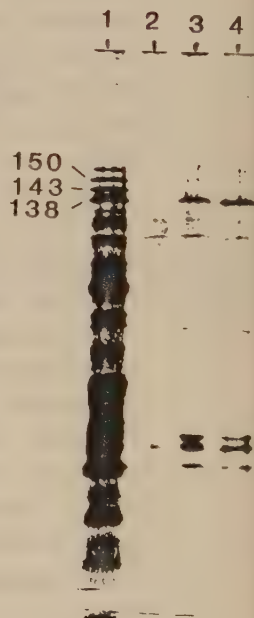
Mit dem partiell gereinigten pUCARG1140-kodierten Antigen wurde ein Kaninchen immunisiert und das daraus gewonnene monospezifische Antiserum auf seine Reaktivität gegenüber EBV-Proteinen untersucht.

Induzierte P3HR1-Zellen wurden mit [³⁵S]-Methionin markiert, das Zelllysate mit dem Kaninchen-Serum und NPC-Pool-Serum (als Kontrolle) inkubiert und die Immunpräzipitate auf SDS-PA Gel aufgetrennt und autoradiographiert (Abb.15). Der NPC Serum Pool erkennt eine ganze Reihe EBV-spezifischer Proteine, darunter auch die charakteristischen drei Banden mit den Proteinen der Größe

138, 143 und 150kDa. Bei dem Kaninchenserum, das vor der Immunisierung gewonnen wurde, tritt noch keine spezifische Erkennung auf. Bei den Seren, die drei und fünf Wochen nach Immunisierung abgenommen werden, kommt es zu einer Reaktion mit dem p138. Dies ist, neben der hybrid-selektionierten Translation von mRNA (s. 1.1.1.), ein weiterer Beweis für die korrekte Identifizierung und Expression von p138.

Abb.15 Immunogenität des pUCARG1140-kodierten Produkts.

12.5% SDS-PAGE von [35 S]-markierten P3HRI-Lysaten nach Immunpräzipitation mit 1) NPC-Serum-Pool, 2) Kaninchenserum vor Immunisierung, 3) drei Wochen, 4) fünf Wochen danach.



1.1.11. Verwendung des Fusionsantigens von pUCARG1140 im ELISA

Das für die Immunisierung verwendete Protein von pUCARG1140 wurde in einem ELISA auf seine Spezifität für IgA- und IgG-Antikörper untersucht. Dazu wurde das Antigen an ELISA-Platten gebunden und mit Seren von NPC-Patienten in unterschiedlichen Verdünnungen inkubiert. Der Nachweis von gebundenen IgG- bzw. IgA-Antikörpern wurde durch peroxidase-gekoppelte anti-humanen IgG- bzw. IgA-Kaninchenantikörper und Peroxidasereaktion geführt. Das Ergebnis ist in Abb.16 gezeigt. Die drei Kontrollen (zwei EBV-negativ-Seren, NPC-Serum-Pool)

zeigen die erwartete Reaktion, insbesondere die beiden negativen Seren mit ihren nur sehr geringen Absorptionen lassen den Schluß zu, daß der Reinheitsgrad des Antigens für einen ELISA ausreichend ist. Bei den NPC-Seren gibt es Reaktionen bis zu Verdünnungen von 1:10240 (Serum No.359). Wichtig ist, daß bei allen Seren eine IgA-Reaktion noch bei erheblich höheren Verdünnungen nachzuweisen war, als sie mit Immunfluoreszenz gemessen werden konnten (Tab.3, Diskussion).



Abb.16 ELISA mit dem pUCARG1140-kodierten Antigen und 10 individuellen NPC-Seren (352-394). Die ersten drei Reihen sind Kontrollen (zweimal EBV-negativ und NPC-Serum-Pool). Die Seren wurden im Doppelansatz getestet und in Stufen von 1:10 bis zu 1:10240 verdünnt.
 Linker Teil: anti-p138/IgG
 Rechter Teil: anti-p138/IgA.
 Auswertung siehe Tab.3.

1.2. Membranantigen gp250/350

Untersuchungen der Zusammensetzung des viralen Envelops führten zur Identifizierung von zwei Glycoproteinen mit Molekulargewichten von 350.000Da und 250.000Da, die gemeinsame antigene Determinanten besitzen (Qualtiere und Pearson, 1980; Thorley-Lawson und Edson, 1979). Der Leserahmen für beide Proteine ist im BamHI-L Fragment lokalisiert. Der Unterschied im Molekulargewicht wird durch einen partiellen 'splice' Vorgang verursacht, der aus der mRNA, die für gp350 kodiert, ein ca. 700nt-Fragment ausschneidet (Beisel et al., 1985). Die verkürzte mRNA kodiert nun für gp250 im selben Leserahmen. Mehr als die Hälfte des Molekulargewichts der beiden Membranproteine wird durch Glycosylierungen verursacht, aber Morgan et al. (1984) konnten zeigen, daß ein Großteil der Antikörper in EBV-positiven Seren gegen den Proteinanteil (907 Aminosäuren bei gp350) und nicht gegen die Zuckerreste gerichtet sind. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, auch diese Proteine in *E.coli* als nicht-glycosylierte Fragmente zu produzieren.

1.2.1. Lokalisation antigener Bereiche in gp250/350

Eine hohe Expression des gesamten ORF von gp250/350 in *E.coli* ist aufgrund der Erfahrung bei p138 nicht sehr wahrscheinlich. Deswegen wurde analog der Expression von p138 vorgegangen und eine Produktion kleinerer, immunogener Subfragmente versucht. Eine mögliche Lokalisation immunogener Bereiche basierend auf der Vorhersage antigener Bereiche zeigt Abb.17. Zusätzlich wurden noch die möglichen Stellen für N-glycosidische Anbindung für Zuckerreste markiert. Deutlich lassen sich hydrophobe Bereiche am N-Terminus ('leader'-Sequenz) und nahe des C-terminalen Endes ausmachen. Stark hydrophile β -turns für die Vorhersage antigener Regionen sind kaum zu finden, nur relativ schwache in den Regionen um aa 50, 340, 500 und 800 bis 820. Dies dürfte auf die starke Glycosylierung des Proteins zurückzuführen sein, die hauptsächlich die Funktion einer hydrophilen Oberfläche übernehmen könnte.

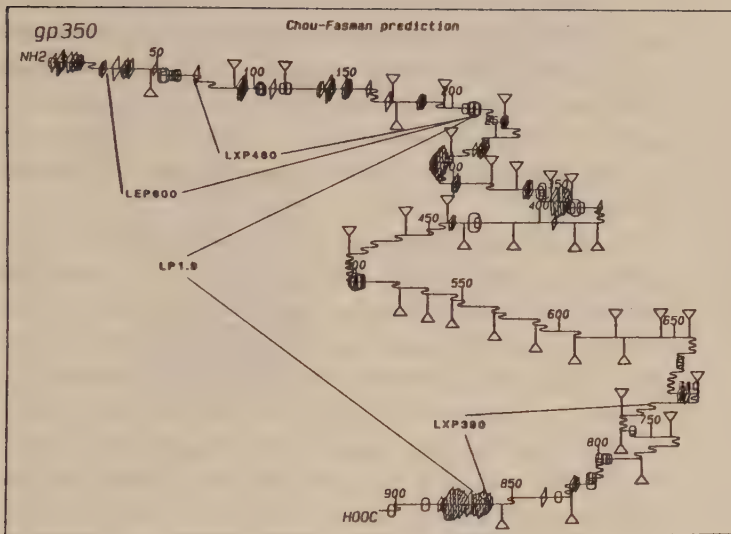


Abb.17 Computer Plot der berechneten Sekundärstruktur von gp250/350 mit hydrophoben (Rauten) und hydrophilen (Kreise) Bereichen. Mögliche Glycosylierungsstellen sind mit Dreiecken gekennzeichnet. Bereiche des Proteins, die als Segmente exprimiert wurden, sind als LEP600, LXP460, LP1.9 und LXP390 bezeichnet. Der Teil bei gp250, der durch "splicing" herausfällt, ist zwischen aa 501 und 750.

1.2.2. Konstruktion von Subklonen und Expression in pUR-Vektoren

Die DNA-Sequenz der in Abb.17 angedeuteten gp250/350-Regionen wurde analog zur Expression von p138 in pUR-Vektoren subkloniert und auf Antigenität untersucht. Vier Subklone wurden konstruiert: pURLEP600, pURLXP460, pURLP1.9 und pURLXP390. Die lineare Anordnung auf der gp250/350-kodierenden Region sind in Abb.18 gezeigt. Für die Konstruktion von pURLEP600 wurde das BamHI-L Fragment mit EcoRI verdaut und eine 600bp-Bande in pUC18 inseriert. Von einem Klon, der das Insert in (-) Orientierung relativ zum lacZ-Leserahmen trägt, (pUC18LE600) wurde das Fragment wieder als BamHI-PstI-Stück isoliert. Die BamHI Stelle stammt dabei aus dem pUC-Polylinker. Da das 600bp-EcoRI-Fragment

in (-) Orientierung eingesetzt wurde, ist die BamHI-Stelle folglich der ursprünglichen 5'-EcoRI-Stelle benachbart. Die PstI-Stelle dieses Stückes stammt aus dem 600bp-EcoRI-Fragment, sie sitzt 30bp vor der ursprünglichen 3'-EcoRI-Stelle. Das so gewonnene BamHI-PstI-Fragment kodiert den N-terminalen gp250/350-Bereich von Aminosäure 32 bis 230. Durch Insertion in pUR291 sitzt die Glycoproteinsequenz im gleichen Leseraster wie die Vektor-kodierte β -Gal (pURLEP600).

pURLXP460 wurde ebenfalls aus pUC18LE600 konstruiert, durch Isolierung einer 460bp-Bande nach XhoI/PstI-Verdau und Insertion in pUR292 linearisiert mit SalI und PstI. Das EBV-Fragment kodiert von Aminosäure 78 bis 230.

Der Klon pURLP1.9 entstand aus der Insertion des 1.9kb-PstI-Fragments von BamHI-L in pUC8 (pUC8LP1.9), Isolierung der EBV-Sequenz als BamHI-HindIII-Fragment und Integration in pUR290. Das so entstandene β -Gal Fusionskonstrukt kodiert für ein gp250/350 Segment von Aminosäure 230 bis 865.

Der C-terminale Bereich von gp250/350 wurde schließlich als XmnI/HindIII-Fragment von pUC8LP1.9 isoliert. (Die HindIII Stelle stammt dabei vom pUC8 Polylinker). Nach der Insertion in pUC19 (pUCLXP390) wurde die EBV-Sequenz wiederum als BamHI-HindIII-Fragment isoliert und in pUR288 integriert (pURLXP390).

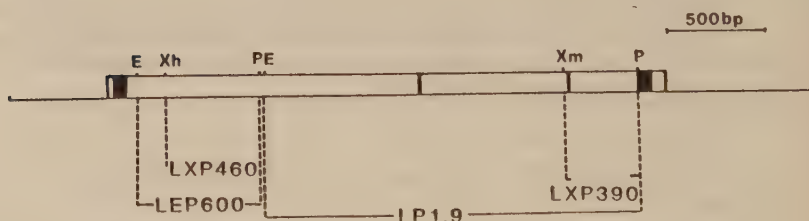


Abb.18 Lokalisation der für Subklonierung verwendeten DNA-Fragmente in der gp250/350-kodierenden Region (offenes Segment), sowie die dafür benutzten Restriktionsenzymstellen.

Schwarzer Bereich am linken Ende, "leader" Sequenz; am rechten Ende, Transmembranregion der Ankersequenz; grauer Bereich, fehlender Bereich bei gp250. E, EcoRI; Xh, XhoI; P, PstI; Xm, XmnI.

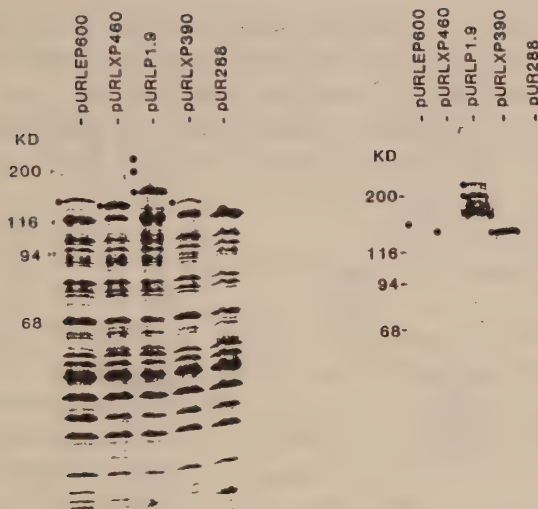


Abb.19 Expression und Antigenität von gp250/350-Segmenten als β -Gal Fusionsproteine.

Links: Coomassie-blau gefärbtes 10%-SDS PAGE der-IPTG induzierten Klone in der in Abb.17 und 18 gezeigten Fragmente.

Rechts: Western Blot der selben Lysate mit anschließender NPC-Serum-Pool Immunfärbung.

EBV-spezifische Banden sind mit schwarzen Punkten markiert. pUR288 als negative Kontrolle.

Die Expression von diesen pUR-Klonen und der Test auf Antigenität ist in Abb.19 gezeigt. Im Coomassie-blau gefärbten PA-Gel sind bei allen Klone neue Banden relativ zur Größe ihrer Insertionen zu erkennen. Bei pURLP1.9 ist das Insert offenbar zu groß, der β -Gal Fusionsteil ist nicht mehr in der Lage das gesamte EBV-Segment vor Proteolyse zu schützen. Aus diesem Grund ist die vollständige Form dieses Proteins kaum mehr sichtbar. Im immungefärbten Western Blot dieser Lysate reagieren die Fusionsproteine von pURLP1.9 und pURLXP390 sehr stark als Antigen, wogegen der Klon pURLEP600 mit dem N-terminalen Bereich von gp250/350 nur eine sehr schwache Reaktion zeigt. Es war erwartet worden, daß dieser Klon ebenfalls als Antigen reagiert, da er die hydrophile 'turn'-Struktur bei Aminosäure 50 enthält. Das Nicht-Reagieren von pURLXP460 bestätigt die Computervorhersage.

Bei pURLP1.9 reagieren die größten Banden, die ja im Coomassie-blau gefärbten Gel kaum sichtbar sind, sehr stark. Dies läßt den Schluß zu, daß gute immunogene Stellen am C-terminalen Teil sitzen, denn nur bei der größten Proteinbande ist dieser Bereich translatiert worden. Die starke Reaktion des Fusionsproteins von pURLXP390 mit dem C-terminalen Bereich bestätigt diese Vermutung.

1.2.3. Expression der gp350/350-Segmente in pUC-Vektoren

Aufgrund der Reaktion von menschlichen Seren gegen β -Gal wurden analog zur p138-Expression pUC-Subklone konstruiert und untersucht, ob diese die gp250/350-Segmente stabil und als Antigene exprimieren. Das Fragment LXP460, das aufgrund der Computervorhersage keine antigene Stelle besitzen sollte und durch die pUR-Expression bestätigt ist, wurde dabei weggelassen.

Der N-terminale Bereich, Fragment LEP600, wurde von dem Plasmid pUC18LEP600 als BamHI/PstI-Fragment isoliert und in pUC8 integriert. Dabei stammt, wie schon bei der Konstruktion des pUR-Klons, die BamHI-Stelle aus dem pUC18-Linker und die PstI-Stelle aus der EBV-Sequenz. Der resultierende Klon pUCLEP600 trägt nun die Insertion im gleichen Leserahmen wie das pUC-kodierte lacZ α -Peptid.

Das 1.9kb-PstI-Fragment wurde in pUC19 inseriert; der resultierende Klon pUC19LP1.9 enthält nun diese Sequenz im richtigen Leserahmen. Der kleine C-terminale Bereich schließlich wurde von dem schon beschriebenen pUC19LXP390 wie bei der pUR-Konstruktion als BamHI-HindIII-Fragment isoliert und in pUC8 eingesetzt (pUCLXP390).

Die Expression von EBV-Antigenen dieser drei pUC-Konstrukte nach IPTG-Induktion ist in Abb.20 gezeigt. Im Coomassie-blau gefärbten Gel ist bei zwei Konstrukten eine zusätzliche Bande zu entdecken; bei pUC19LP1.9 eine sehr schwache im Bereich von ca. 120kDa und bei pUCLXP390 im Bereich von ca. 20kDa.

Im Western Blot reagiert das große pUC19LP1.9-kodierte Protein wie im korrespondierenden pUR-Klon sehr stark; das C-terminale Fragment von pUCLXP390 dagegen zeigt fast keine Reaktion mehr. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, daß mit dem Fehlen der großen β -Galaktosidase zwar noch die Stabilität vorhanden ist, daß sich aber das kleine Peptid ohne zusätzliche Anteile so faltet, daß das Epitop abgedeckt wird, oder eine völlig andere Struktur einnehmen muß

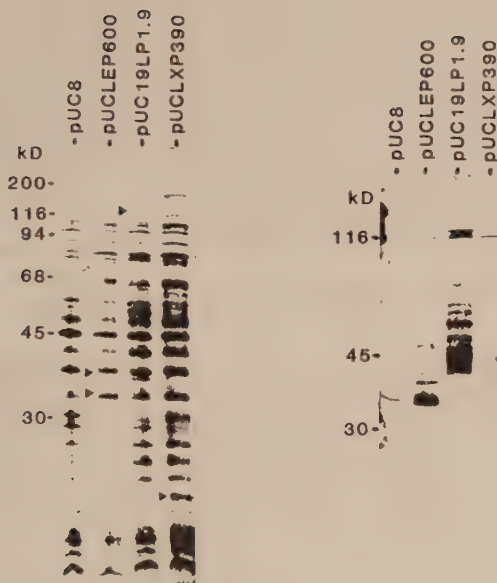


Abb.20 Expression der gp250/350-Segmente in pUC-Vektoren.
links: Coomassie-blau gefärbtes 17.5%-SDS PAGE mit den angezeigten IPTG-induzierten Klonen, Positionen von EBV-kodierten Segmenten sind mit Dreiecken angezeigt.
rechts: Western Blot und Immunfärbung mit NPC-Serum-Pool derselben Lysate.

Überraschenderweise reagiert der N-terminale Bereich von pUCLEP600 im Vergleich zum korrespondierenden β -Gal Fusionsprotein sehr stark. Das Translationsprodukt ist nicht besonders stabil, es entstehen zwei Banden mit ca. 38 und 33kDa, die im Coomassie-blau gefärbten Gel durch zwei bakterielle Banden verdeckt sind. Die Reaktion als Nicht-Fusionsprotein bzw. das Nicht-Reagieren als β -Gal Fusionsprotein (pURLEP600, Abb.19) läßt sich eventuell dadurch erklären, daß die vermutete antigene Stelle bei aa 50 nur 18 aa von dem β -Gal::gp250/350 Übergang entfernt liegt. Dies könnte bedeuten, daß der bakterielle Fusionspartner die Anlagerung von Antikörpern sterisch behindert.

Die Degradation oder unvollständige Translation bzw. Transkription des pUC19LP1.9-Produktes ist im Western Blot sehr deutlich zu erkennen, da ein sehr großer Teil der EBV-spezifischen Expressionsprodukte in einem Bereich von 40-70kDa wandert, nur ein kleiner Teil besitzt die volle Länge von 120kDa. Theoretisch sollte dieses Translationsprodukt in einem Bereich von ca 70-80kDa wandern. Das beträchtlich höhere Molekulargewicht im SDS-PA Gel wird wahrscheinlich durch die vielen Prolinreste in der Aminosäure-Sequenz verursacht. Diese verhindern ein vollständiges Auffalten der Kette während der Gelelektrophorese, was eine verlangsamte Wanderung bedingt.

1.2.4. Versuche zur Stabilisierung der gp250/350-Segmente

Zunächst wurde getestet, ob das sehr antigene große Segment (pUC19LP1.9) sich durch eine andere Anordnung relativ zur β -Gal stabilisieren läßt. Bei dem Klon pURLP1.9 ist der EBV-Anteil C-terminal der β -Gal fusioniert. Für die umgekehrte Anordnung dieser beiden Teile wurde das Plasmid pMF2 benutzt, bei dem Klonierungsstellen für BamHI und HindIII am 5'-Ende der β -Gal sind. (Das Plasmid wurde von M.Bröcker zur Verfügung gestellt). Mit den beiden Enzymen wurde die gp250/350-Sequenz als 1.9kb-Bande von pUC19LP1.9 isoliert und in dieses Plasmid integriert. Durch diese Anordnung der beiden Fusionspartner läßt sich aber keine höhere Stabilität erzielen; die Menge an vollständig translatiertem Produkt ist relativ gering, und es treten eine Vielzahl kleinerer Banden auf. (Im Coomassieblau-gefärbten Gel ist die größte Bande mit ca. 250kDa nur sehr schwach erkennbar; nicht gezeigt)

Mit weiteren Konstrukten wurde versucht, das Produkt des 1.9kb-PstI-Fragments mit dem sehr stabil exprimierten FR.IV von p138 zu fusionieren.

pUCLP1.9 wurde dazu mit EcoRI verdaut und religiert; auf diese Weise ist die 5'-PstI-Stelle eliminiert worden. (EcoRI schneidet im Polylinker und 30bp nach der 5'-PstI Stelle des 1.9kb-Fragments.) Der resultierende Klon wurde nun mit PstI linearisiert und FR.IV von p138 als 600bp-PstI-Fragment integriert. Bei den resultierenden Klonen wurde auch ein Plasmid gefunden, daß die FR.IV Sequenz zweimal Kopf-Schwanz inseriert hatte. Der Übergang der Leseraster stimmt am 3'-Ende des gp250/350-Inserts in den von FR.IV. Außerdem hat FR.IV denselben Raster am 5'- und 3'-Ende, so daß beide FR.IV-Sequenzen translatiert werden sollten.

Die drei pUC-Klone mit keinem, einem, und zwei FR.IV Insertionen wurden mit EcoRI-HindIII verdaut und die EBV-Fragmente mit 1.9, 2.5 und 3.1kb in den Vektor pINIII Δ 3 inseriert, so daß der Leseraster des EBV-Fragments an der

EcoRI-Stelle mit dem des Transkripts des Lipoprotein-Promotors übereinstimmt. Die Expression von pINLP1.9, pINLP2.5 und pINLP3.1 ist in Abb.21 gezeigt. Auch diese Manipulation brachte nicht die gewünschte Verbesserung. Im Vergleich zu pUC19LP1.9 wurde von dem vergleichbaren Plasmid pINLP1.9 sogar erheblich weniger exprimiert, was eventuell mit einer verschlechterten Promotorwirkung oder auf den anderen Linker zurückzuführen ist (s. auch Expression von EBNA1 in pUC18 und pUC8). Durch die Fusionierung des stabilen p138-Segments steigt zwar das Molekulargewichts jeweils an, aber eine Steigerung der Ausbeute wird dadurch auch nicht erreicht.

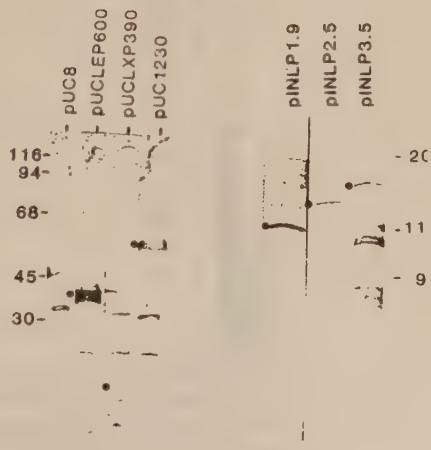
Mit einem weiteren Konstrukt wurde versucht, die Stabilität des N-terminalen Teils von gp250/350 (pUCLEP600) ebenfalls durch Fusion mit dem FR.IV-kodiert stabilen p138-Fragment zu steigern. Das Konstrukt pUC1230 wurde erhalten durch Linearisierung von pUCARG601 (s. 1.1.2.) und Insertion des 600bp-PstI-Fragments aus pUC18LE600. (Je eine PstI-Stelle stammt aus dem Polylinker bzw. EBV-Insert.) Das Ergebnis ist in Abb.21 gezeigt. Die Größe des Expressionsprodukts ist ein Beweis für korrekte Integration des gp250/350-Inserts.

In einem letzten Konstrukt zur gp250/350 Expression in E.coli wurden schließlich noch die antigenen Enden des Proteins fusioniert. Das 600bp-PstI Fragment von pUC18LE600 wurde dazu in die PstI-Stelle von pUCLXP390 integriert. Der daraus resultierende Klon produzierte aber kein nachweisbares Produkt; d.h. durch Fusionierung sind beide Segmente, die für sich etwas stabil bleiben, nicht mehr stabil produzierbar.

Abb.21 Expression von gp250/350-Teilen als Fusionsproteine mit dem FR.IV-kodierten p138-Segment.

links: 17.5%-SDS PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunfärbung von pUC1230, zusätzlich sind noch Lysate mit Nicht-Fusionsproteinen pUCLEP600 und pUCLXP390 mit aufgetragen.

rechts: 10%-SDS PAGE mit den Lysaten der Klone mit dem 1.9kb-PstI gp250/350-Fragment fusioniert an FR.IV (Immungefärbter Western Blot).



1.2.5. Reinigung des β -Gal::gp250/350-Fusionsproteins von pUCLP1.9 und Immunisierung von Kaninchen

Wie das von pUCARG1140-kodierte p138-Fusionsprotein liegt auch das von pURLP1.9 kodierte Protein unlöslich in der Zelle vor, d.h. nach Lyse der Bakterien wurde es im Pellet gefunden und war nur durch 8M Harnstoff in Lösung zu bringen, was wohl eine generelle Eigenschaft von β -Gal Fusionsproteinen zu sein scheint (Stanley, 1983). Die Unlöslichkeit wurde als erster Reinigungsschritt benutzt, um alle löslichen E. coli-Proteine abzutrennen. Anschließend wurden die verbleibenden Proteine in 8M Harnstoff auf einer Molekularsiebsäule (Sephacrose 2B-CL) aufgetrennt. Das β -Gal::gp250/350-Fusionsprotein besitzt eine Größe von 120kDa bis 230kDa (aufgrund von unvollständiger Translation/Transkription). Da in diesen Molekulargewichtsbereichen wenig Bakterienproteine vorkommen, läßt sich durch diese Säulenchromatographie eine gute Reinigung erzielen. Das Ergebnis ist in Abb.22 gezeigt.

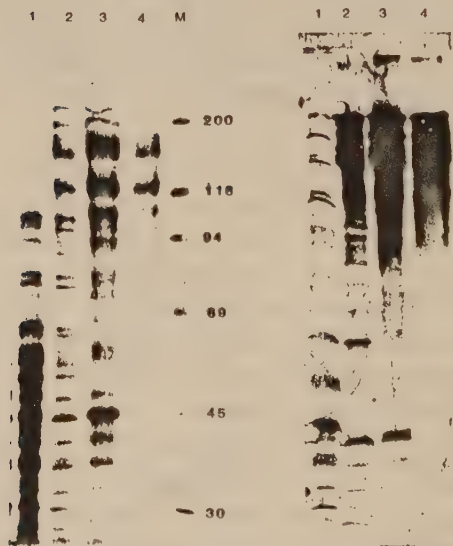


Abb.22 Reinigung des pURLP1.9-kodierten β -gal:gp350-Fusionsproteins
links: Coomassie-blau gefärbtes 10% SDS-PAGE.
rechts: Western Blot und Immunfärbung.
Spur 1: Lysat des nicht-induzierten Klons; 2: IPTG induziert; 3: unlösliche Proteinfraktion; 4: positive Fraktionen nach Molekularsieb-Chromatographie (Sephacrose 2B-CL, Pharmacia) in 8M Harnstoff.

Es wurde zusätzlich noch versucht, eine Reinigung mit einer IPTG-Affinitäts-Chromatographie zu erreichen. Dies war jedoch nicht möglich, da bei einer Dialyse das Protein wieder unlöslich wurde. Für eine Affinitätschromatographie ist aber die native Form der β -Galaktosidase erforderlich.

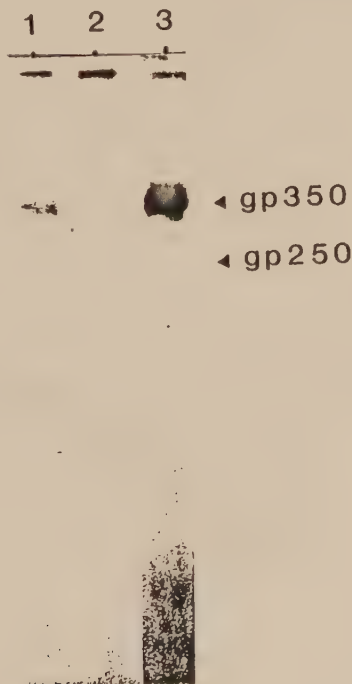
Mit dem partiell gereinigten Fusionsprotein wurde ein Kaninchen immunisiert und das gewonnene Serum verwendet, die Spezifität des Expressionsproduktes nachzuweisen.

Dazu wurden B95-8 Zellen mit [125 J]-Oberflächen markiert und die Membranproteine mit NP40 extrahiert. Lösliche Proteine davon wurden anschließend mit dem Kaninchenserum immunpräzipitiert, aufgetrennt und autoradiographiert (Abb.23).

Die Erkennung des EBV-Membranproteins ist der Beweis für die korrekte Expression dieses Proteins in E.coli.

Abb.23 Immunogenität des pURLP1.9-kodierten Fusionsproteins
7.5% SDS-PAGE mit Immunpräzipitaten von [125 J]-Oberflächen-markierten B95-8 Zellen.

Spur 1: Immunpräzipitat von gp250/350 mit Kaninchenserum, sechs Wochen nach Immunisierung mit dem pURLP1.9-kodierten Protein; Spur 2: mit dem Kaninchenserum vor Antigengabe; Spur 3: Immunpräzipitation mit dem NPC-Serum-Pool als Kontrolle.



Mit diesem Serum wurde zusätzlich noch untersucht, ob es EBV-neutralisierende Antikörper hat. EBV-negative BJA-Zellen wurden mit EBV (B95-8) infiziert. Das Virus war zuvor mit dem anti-gp250/350 Serum inkubiert worden; unbehandelte Kontrollansätze wurden ebenfalls getestet. Die Infektion mit dem unbehandelten Virus verlief erfolgreich, auf einem Western Blot der BJA Zellen war EBNA-1 nachweisbar. Nach Infektion mit dem Serum-behandelten Virus konnte diese Bande nicht gefunden werden, was darauf hindeutet, daß die Antikörper in der Lage sind, das Virus zu neutralisieren.

1.3. Viruskapsidantigen p150

Der IgA-Titer gegen die viralen Kapsidkomponenten von EBV ist der am besten untersuchte Marker bei der serologischen Früherkennung und Verlaufskontrolle von NPC (Epstein und Achong, 1979). Aus diesem Grund wurde ein Vertreter dieser Gruppe, das p150 (Pearson, 1985) exprimiert. Das Leseraster dieses Proteins startet im BamHI-'c' Fragment, endet im BamHI-D und kodiert für 1382 Aminosäuren (Seibl und Wolf, 1985). Eine Expression des gesamten Proteins erschien aufgrund der Erfahrung von p138 als nicht zweckmäßig. Abb.24 zeigt die Sekundärstruktur mit hydrophilen Regionen. Antigene Regionen können demnach in den Bereichen des N-Terminus und in den Regionen um aa 480, 910, 1080 und um 1200 erwartet werden.

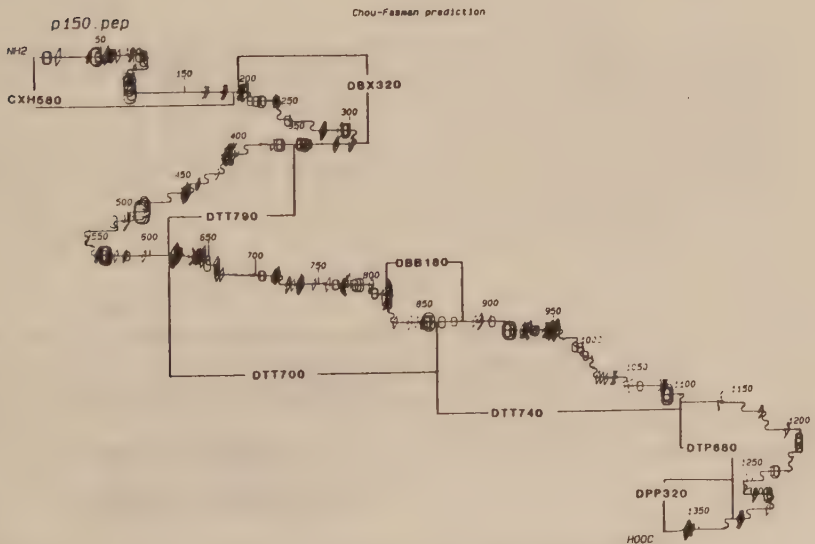


Abb.24 Lokalisation möglicher antigener Stellen in der Aminosäuresequenz von p150.

Bei der Chou-Fasman Vorhersage können aufgrund der gewählten Größe nur β -turn Regionen (Drehung um 180°) erkannt werden. Hydrophobe bzw. -phile Bereiche sind als Rauten bzw. Kreise gezeichnet. Ebenfalls sind die den subklonierten DNA-Fragmenten (CXH580 - DPP320) entsprechenden p150 Segmente markiert.

1.3.1. Expression der 150-Segmente in pUR-Vektoren

Analog zu den schon beschriebenen Ansätzen wurde die Computervorhersage überprüft, indem die kodierende Region für p143 subkloniert und die Protein-segmente als β -Gal::p150-Fusionsproteine auf ihre Immunogenität untersucht wurden.

Die Konstruktion erfolgte wieder zuerst in pUC-Vektoren und Umklonierung der p150-Insertionen (Abb.25) in die entsprechenden pUR-Vektoren nach Isolierung mit BamIII und HindIII. Die Restriktions-Schnittstellen für die Subklonierung sind in Abb.25 angegeben. XhoI schneidet die Sequenz 36bp vor dem Translationsstart. Der Klon pUR290CXH580 kodiert deshalb noch zusätzlich 12 Aminosäuren aus der 5'-untranslatierten Region.

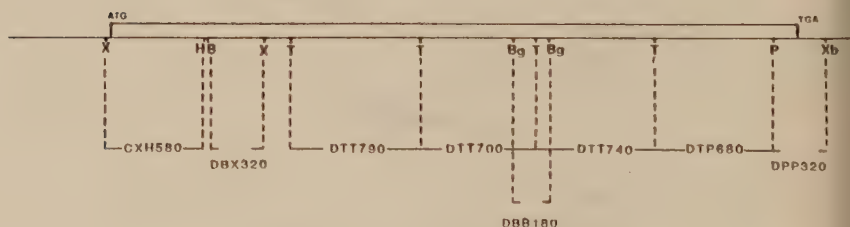


Abb. 25. Lokalisation der für die p150-Subklonierung verwendeten DNA-Fragmente sowie die für ihre Isolierung benutzten Restriktionsenzym-Stellen.

ATG bzw. TGA bezeichnen den Translationsstart bzw. -stop des p150 ORF (offenes Segment). Im unteren Teil sind die subklonierten DNA-Fragmente aufgeführt, wobei die Zahl den bp entspricht.

X, XhoI; H, HindIII; B, BamIII; T, TaqI; Bg, BglII; P, PstI; Xb, XbaI.

Die Ligierung der XhoI- bzw. TaqI-Enden erfolgte in die SalI- bzw. AccI-Stelle der pUC-Vektoren. Das Fragment des BglII-Verdaus wurde direkt in die BamIII-Stelle von pUR292 kloniert. Die Expression von β -Gal::p150-Segmenten ist als Coomassie-blau gefärbtes Gel sowie als mit NPC-Serum-Pool entwickelter Western Blot in Abb.26 gezeigt. Wie erwartet, besitzen alle Subklone im Coomassie-blau gefärbten Gel zusätzliche Banden, abhängig im Molekulargewicht von der

Insertgröße. Als Antigen wird sehr stark das N-terminale Segment von pUR290CXH580 erkannt. Daneben zeigen noch die Fusionsproteine von pUR288DTT770 aus dem mittleren Bereich des Proteins sowie vom C-terminalen Teil eine schwache Reaktion. Abgesehen vom Fehlen einer Reaktion bei der vorhergesagten antigenen Stelle um aa 480 (in pURDTT790) stimmt dieses Ergebnis wiederum recht gut mit der Computervorhersage überein.

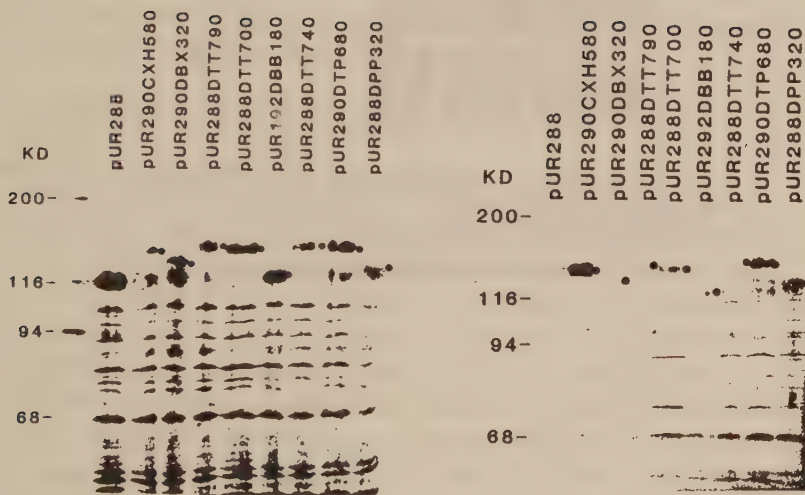


Abb.26 Expression und Immunogenität der p150-Segmente als β -Gal Fusionsproteine.

links: Coomassie-blau gefärbtes 10%-SDS PA Gel mit den IPTG-induzierten Lysaten der p150-Subklone.

rechts: dieselben Lysate nach Western Blot und Immunfärbung mit dem NPC-Serum-Pool (pUR288 als negative Kontrolle).

β -Gal Fusionsproteine sind mit schwarzen Punkten gekennzeichnet.

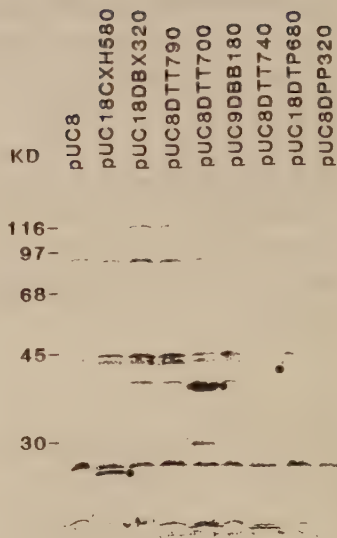
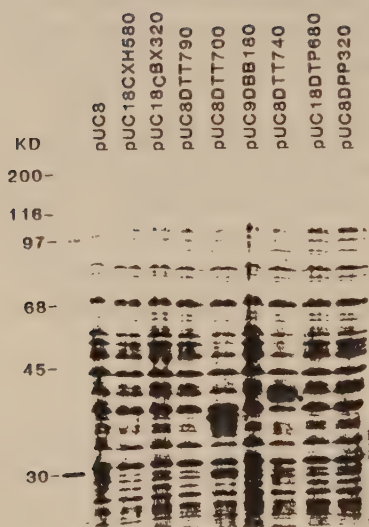


Abb.27 Expression und Immunogenität von p150-Segmenten als Nicht-Fusionsproteine in pUC-Vektoren
links: Coomassie-blau gefärbtes 15%-SDS PA Gel.
rechts: Western Blot und Immunfärbung mit dem NPC-Serum-Pool.
p150-spezifische Proteinbanden sind mit einem Punkt markiert.

1.3.2. Expression der 150-Segmente in pUC-Vektoren

Die bei der Konstruktion der pUR-Plasmide erhaltenen pUC-Konstrukte wurden auf eine stabile Expression ihrer p150-Insertionen getestet. Bei der Konstruktion war darauf geachtet worden, daß pUC-Vektoren verwendet wurden, die im Leseraster mit den p150-Insertionen übereinstimmten. Das Ergebnis ist als Coomassie-blau gefärbtes Gel sowie als Western Blot derselben Lysate in Abb.27 gezeigt. Das sehr antigene Segment vom N-terminalen Bereich ist im gefärbten Gel nicht zu erkennen, aber im Western Blot reagiert eine Bande mit ca. 24kDa sehr stark, d.h. das Segment wird nicht besonders stabil als Nicht-Fusionsprotein produziert, ist aber ein sehr gutes Antigen. Die Segmente von pUC8DTT700 sowie von pUC8DTT740 werden in großer Menge stabil produziert, von diesen reagiert eines (pUC8DTT700), wie schon als pUR-Klon, mit dem NPC Serum Pool. Obwohl ein direkter Vergleich der Stärke der antigenen Reaktion schwierig ist, scheint es, daß das Nicht-Fusionsprotein stärker reagiert. Eventuell findet eine sterische Hinderung der Antikörperbindung an das β -Gal::p143-Protein statt, wie es auch schon bei einem gp250/350 Konstruktpaar postuliert wurde (pURLEP600 und pUCLEP600).

1.3.3. Reinigung des hauptantigenen Segments

Ideal für die Verwendung im ELISA-Test wäre das Nicht-Fusionsprotein von pUC18CHX580 mit dem N-terminalen Segment. Da die Menge jedoch sehr gering ist, wurde das korrespondierende β -Galaktosidase Fusionsprotein aufgereinigt. Aufgrund seiner Unlöslichkeit und Größe wurden dieselben Bedingungen wie bei pURLP1.9 gewählt: Lyse der Bakterien, Lösen des Pellets in 8M Harnstoff und Molekularsiebsäule. Als Ergebnis wurde ein zu ca. 80% reines Fusionsprotein erhalten. Die korrekte Expression und Authentizität des Proteins wurde durch Immunisierung von Kaninchen und Verwendung des Serums in einer Immunpräzipitation von [35 S]-Methionin-markierten Proteinen von P3HR1-Zellen überprüft (nicht gezeigt).

1.4. EBV-spezifisches nukleäres Antigen EBNA-1

In der Routine-Diagnostik spielen Antikörper gegen den EBNA-Komplex eine wichtige Rolle, da sie als sicheres Indiz für vorangegangenen Kontakt mit dem Virus gelten. Die in infizierten B-Lymphozyten latent produzierten und bei der Zelldegradation dem Immunsystem präsentierten Proteine sorgen für einen permanenten anti-EBNA-Titer. Durch anti-Komplement-Immunfluoreszenzen mit verschiedenen Seren wurde erkannt, daß sich der EBNA-Komplex aus mindestens zwei Antigenen zusammensetzt (Reedman und Klein, 1973; Strnad et al., 1981). Eine Hauptkomponente dieser Klasse, das EBNA-1-Protein, wird im BamHI-K Fragment von einem ORF mit 641 aa (B95-8 Sequenz) kodiert, wobei in der N-terminalen Hälfte eine Vielzahl von kurzen Repeatstrukturen auftreten (Abb.28; Hennessy et al., 1983a).

1.4.1. Expression eines EBNA-1-Segments

Bei der Expression in Bakterien wurde vermieden, den N-terminalen Teil mit den 'repeat'-Strukturen zu exprimieren. Von BamHI-K wurde ein 1.2kb SmaI/HindIII-Stück isoliert und sowohl in pUC18, linearisiert mit HincII/HindIII, als auch in pUC8, linearisiert mit SmaI/HindIII, integriert (Abb.28)

Die SmaI-Stelle schneidet bei aa 470, HindIII 628bp hinter dem Stopcodon des EBNA-1-Leserahmen, die Sequenzen von der SmaI-Stelle bis zum Translationsstop kodieren für 171 aa. Die Ligation mit der SmaI-Stelle in pUC8 ergibt den richtigen Übergang des Leserasters vom pUC-kodierten lacZ α -Transkript zum EBNA-1-Raster.

Die Insertion des 1.2kb-SmaI/HindIII-Fragments in pUC18 wurde durchgeführt, um von einem resultierenden Klon die EBV-Sequenz mit BamHI/HindIII für eine Umsetzung in pUR-Vektoren isolieren zu können. Bei der Austestung der pUR-Klone wurden jedoch keine produzierenden Klone gefunden; offensichtlich war bei dem verwendeten pUC-Klon (pUC18KHH1.2) durch die 'blunt end'-Ligierung der Leseraster durch eine Insertion/Deletion verschoben worden (siehe auch pUCLM1, pMDIIGP-Konstruktion).

Im Gegensatz zur SmaI/SmaI-Ligierung bei pUC8KSH1.2 ist eine Überprüfung des Übergangs durch Restriktionsverdau nicht möglich, da sowohl die SmaI- als

auch die HincII-Stelle zerstört wird.

Bei pUC18KHH1.2 sollte theoretisch der Leseraster nach den Sequenz-Daten um +1 verschoben sein, da aber eine Deletion/Insertion vorhanden sein muß, besteht die Möglichkeit, daß der Raster wieder stimmt. Deshalb wurden beide pUC-Klone auf Expression von EBNA-1 getestet (Abb.29).

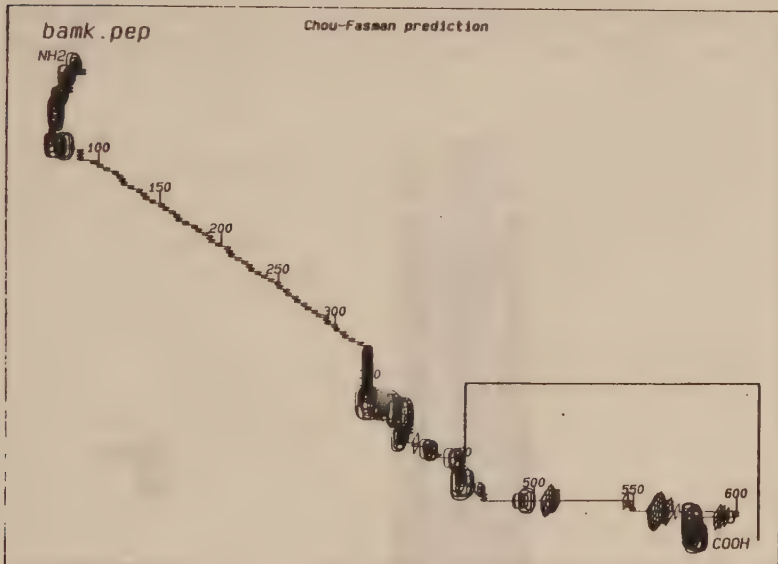


Abb.28 Berechnete Sekundärstruktur von EBNA-1 mit hydrophoben (Rauten) und hydrophilen (Kreise) Bereichen

Das Protein besitzt eine Reihe extrem hydrophiler Regionen mit β -turn Strukturen; subkloniert und exprimiert wurde der mit einer Linie gekennzeichnete C-Terminus. Deutlich ist der "Repeat"-Bereich zwischen aa90 und aa350 mit β -turn Struktur zu erkennen.

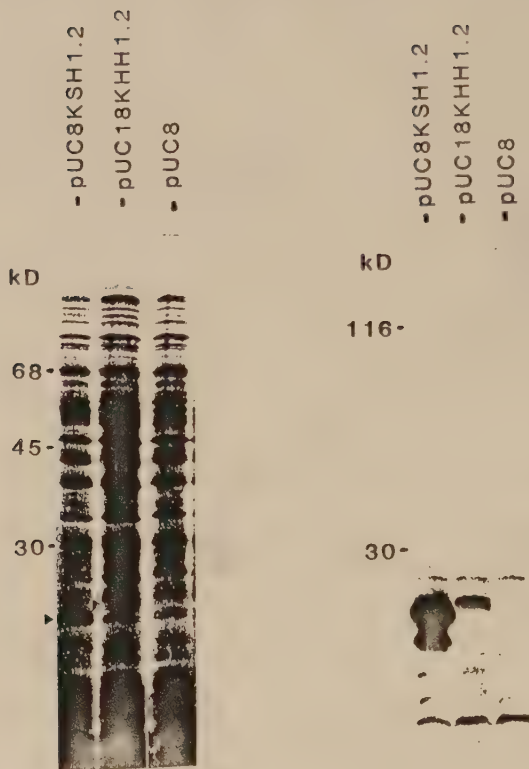


Abb.29 Expression des C-terminalen EBNA-1-Segments von pUC8 (pUC8KSH1.2) und pUC18 (pUC18KHH1.2)

links: Coomassie-blau gefärbtes 17.5%-SDS PA Gel.

rechts: Western Blot und Immunfärbung mit NPC-Serum-Pool.

pUC8 als Kontrolle; Positionen der EBNA-1 Segmente im Coomassie-blau gefärbten Gel sind angezeigt.

Im Coomassie-blau gefärbten Gel ist keine zusätzliche Bande zu entdecken, aber bei dem mit NPC-Serum-Pool entwickelten Western Blot ist eine deutliche Reaktion zu finden. Das EBNA-1 Segment von pUC8KSH1.2 wird in größerer M als von pUC18KHH1.2 produziert. Der Unterschied zwischen den beiden Konstrukten besteht in den unterschiedlichen Linker-Sequenzen. pUC18KHH1.2 hat zusätzlich noch 10 aa-Codons, bedingt durch den längeren pUC18-Linker und durch die Insertion in die HincII-Stelle (statt SmaI wie bei pUC8KSH1.2; vorausgesetzt, daß bei der Ligierung die Deletion von nur einem Nukleotid auftrat). Diese längere Aminosäuresequenz am Anfang scheint dafür verantwortlich zu sein, daß das Produkt von pUC18KHH1.2 um ca. 1kDa größer ist und in geringer Ausmaß produziert wird.

1.5. Frühes Antigen p54

Als Hauptkomponenten des frühen Antigenkomplexes wurden, neben p138, noch Proteine mit ca. 50kDa (p54, EA-D) und 85kDa (p85, EA-R) identifiziert (Pearson, 1985). Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen p54 wurde gefunden, daß dieses Protein im Kern und Cytoplasma von lytisch infizierten Zellen verteilt ist (Kishishita et al, 1985). NPC-Seren zeigten eine sehr gute Reaktivität gegen dieses EBV-Protein (Abb.1), das im BamHI-M Fragment von dem ORF BMRF1 kodiert wird (Seibl und Wolf, 1985).

1.5.1. Expression von p54

Der Leserahmen startet 6nt nach einer BclII-Stelle und kodiert für 405 aa. Für die Subklonierung wurde diese BclII-Stelle sowie eine EcoRI-Erkennungssequenz ca. 2.0kb 3' des p54-Stopcodons verwendet. Dieses Fragment mit 3.2kb wurde in die BamHI/EcoRI-Stellen von pUC9 inseriert. (BamHI und BclII besitzen dieselben 'sticky ends'.) Das resultierende Plasmid, pUC9MBcE3.2 enthält nun die gesamte p54-kodierende Region sowie 12 zusätzlich Aminosäuren am N-Terminus vom pUC9-Linker.

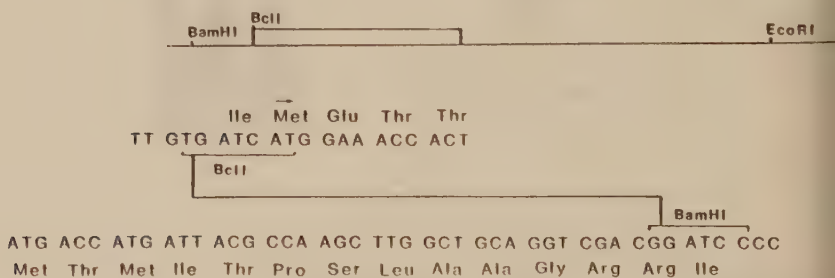


Abb.30 Konstruktion des p54-Expressionvektors pUC9MBcE3.2
Gezeigt ist der Bereich von BamHI-M mit dem p54-ORF (offenes Segment), sowie die Sequenz vom Leserahmen mit dem Translationsstart und der unmittelbar davor liegenden BclII-Stelle. Darunter ist der bakterielle Anteil von pUC9 vom Start des lacZ α -Proteins bis zur BamHI-Stelle aufgeführt.

Im Coomassie-blau gefärbten Gel mit dem Lysat des IPTG-induzierten Klons pUC9MBcE3.2 ist nur schwer eine zusätzliche Proteinbande im Bereich von 54kD zu finden, aber der Western Blot mit NPC-Serum zeigt eine sehr starke Reaktion in der erwarteten Region (Abb.31). Die Menge an exprimiertem Protein ist nicht allzu groß, aber die Immunogenität sehr gut. Deshalb wurde darauf verzichtet, die Sequenz zu subklonieren und Fragmente zu exprimieren.

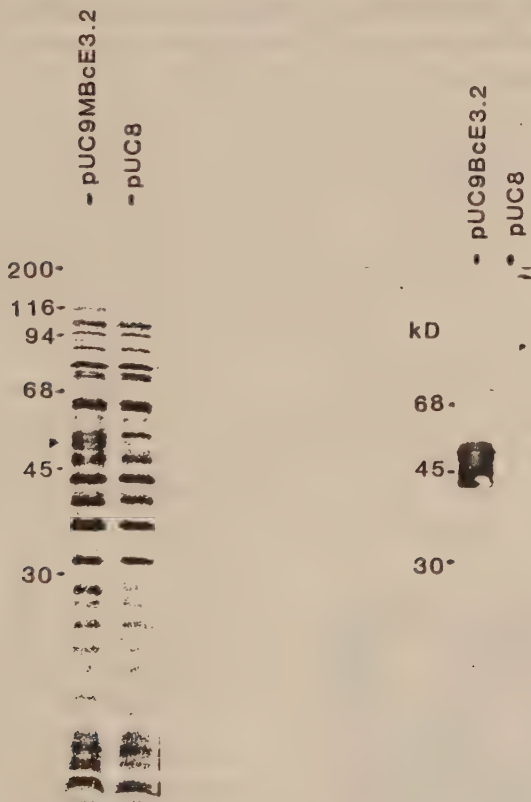


Abb. 31. Expression und Immunogenität des p54-Expressionproduktes von pUC9MBcE3.2.
links: Coomassie-blau gefärbtes 17.5% SDS-PA Gel.
rechts: Western Blot und Immunfärbung mit dem NPC-Serum-Pool (pUC8 als negative Kontrolle).

2. Expression von EBV-Protelen in eukaryotischen Systemen

2.1. Verwendung eines retroviralen Vektors und Transformation von 3T3 Zellen

Die permanent wachsende Mäusezelllinie 3T3 wird nach Transfektion mit Moloney Sarcom Virus-DNA transformiert. Dies geht mit einer phänotypischen Veränderung einher. Die Zellen verlieren ihre Kontaktinhibition und wachsen in Zellhaufen (Foci). Außerdem ändern sie ihre epitheloide Zellform und nehmen ein spindelförmiges Aussehen an. Die Transformation wird durch das virale mos-Oncogen verursacht.

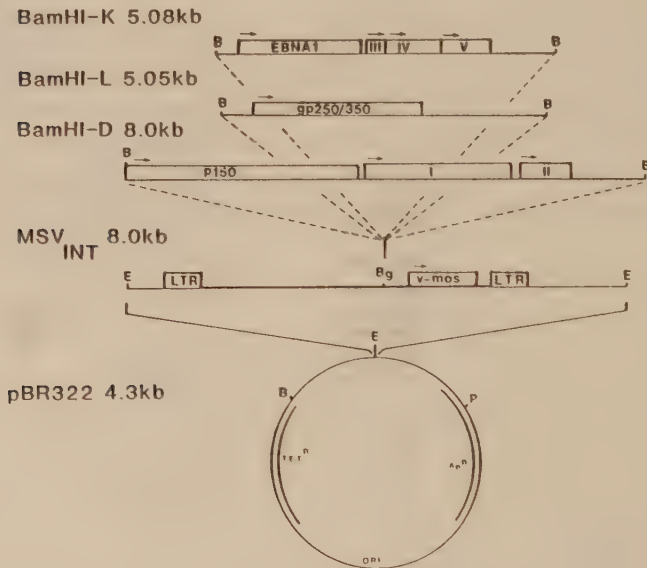


Abb.32 Konstruktion der pMSV-ERV Expressionsvektoren

Der bakterielle Teil des Vektors besteht aus pBR322-Sequenzen; in die EcoRI-Stelle ist die provirale Sequenz von MSV eingesetzt. Zusätzlich sind links noch ca. 600bp und rechts noch 2300bp mit zellulären Sequenzen.

MSV-Sequenzen (dickerer Strich) mit den 5'- und 3'-LTR Sequenzen; die BglIII Stelle (Bg) wurde für die Insertion von EBV Sequenzen benutzt; v-mos ist als offenes Segment angezeigt.

Im oberen Teil die drei inserierten BamHI-Fragmente. Bekannte ORF sind aufgeführt, zusätzlich vorhandene ORF, deren Proteine noch nicht genau zugeordnet werden können, sind mit I-V bezeichnet.

Für die Konstruktion der retroviralen EBV-Expressionsplasmide wurde pMSV (Stratowa et al., 1982) benutzt, das die provirale Sequenz des Moloney Sarkom Virus (MSV) in der EcoRI-Stelle von pBR322 enthält. Das ca. 8000bp-lange DNA Fragment besitzt eine einzelne BglII-Stelle ca. 300bp 3' des mos-kodierenden Leserasters, die für die Integration der EBV-Sequenzen benutzt wurde. Durch die fremden Sequenzen wird die Transkription des v-mos nicht verhindert; die mRNA wird entweder innerhalb der LTR-Sequenz gestartet und durch 'splicing' prozessiert, oder es wird ein zweiter Promotor unmittelbar vor dem v-mos Gen benutzt. (J.Doeher, persönliche Mitteilung). In die BglII-Stelle wurden drei EBV-BamHI-Fragmente inseriert: BamHI-D, -L und -K. BamHI-D wurde gewählt, weil p150 kodiert wird, BamHI-L für eine Expression des Membranproteins gp250/350 und BamHI-K für EBNA-1 (s. auch Expression in Bakterien). Die resultierenden Konstrukte enthielten die BamHI-Fragmente in der Orientierung, daß die Leseraster der ausgewählten Proteine dieselbe 5'-3' Richtung hatten, wie das von LTR gestartete Transkript (Abb.32).

Nach Transfektion der Konstrukte mit Hilfe von Kalzium-Phosphat Präzipitation entstanden in allen Fällen Foci, die isoliert werden konnten.

Die transformierten Klone wurden auf Expression von EBV-Proteinen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Tests, Immunpräzipitationen von [³⁵S]-Methionin markierten Zellysaten und Western Blots untersucht. Bei den Immunfluoreszenz-Tests zeigte nur der 3T3-Klon mit dem EBV BamHI-K Fragment eine Reaktion (Abb.33).

Aufgrund der Lokalisation dieser Fluoreszenz im Zellkern und der typischen granulären Verteilung kann sie als EBNA-1-spezifisch klassifiziert werden.

Bei den restlichen 3T3-[MSV::EBV]-Klonen war keine Fluoreszenz feststellbar.

Abb.33 Expression von EBNA-1 in 3T3-Zellen, Nachweis durch Immunfluoreszenz
pMSV-BamHI-K transformierte 3T3-Zellen nach Fixierung mit Aceton/Methanol, Inkubation mit einem speziellen hochtitrigen anti-EBNA Serum und Komplement sowie Nachweis von gebundenen Antikörpern mit FITC-konjugierten anti-Komplement-Antikörpern. Negative 3T3-Zellen zeigen keine oder nur unspezifische Hintergrund Reaktionen im zytoplasmatischen Bereich (nicht gezeigt), die EBNA-positiven dagegen eine starke Kernfluoreszenz.



Der mit dem NPC-Pool-Serum gefärbte Western Blot mit Lysaten der 3T3 Klone zeigte nur bei dem Fluoreszenz-positiven EBNA-1 Klon eine EBV-spezifische Bande in der Größe von etwa 80kDa (Abb.34). Als Kontrolle bei diesem Experiment wurde ein Lysat von P3HR1-Zellen verwendet, die ein EBNA-1 mit etwas verändertem Molekulargewicht produzieren als B95-8, vom dem die verwendete DN stammt. Die unterschiedliche Anzahl von Repeatstrukturen im N-terminalen Teil der EBNA-1-kodierenden Region ist dafür wahrscheinlich verantwortlich.

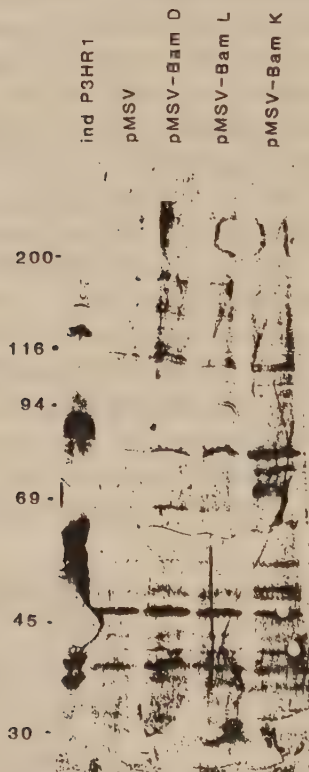


Abb.34 Nachweis von EBNA-1 in 3T3-Zellen durch 12.5%-SDS PAGE, Western Blot und Immunfärbung mit dem NPC-Serum-Pool
Aufgetragen wurden Lysate von je 10^6 Zellen von induzierten P3HR1-Zellen (positive Kontrolle), pMSV-transformierte (negative Kontrolle) sowie mit pMSV-BamIII-D, -L und -K transformierte 3T3-Zellen.
Nur bei BamIII-K zeigt sich eine spezifische, neue Bande im Bereich von ca. 80kDa.

2.2. Expression der Membranproteine gp250/350 in CHO-Zellen

Die geplante Verwendung von pMSV als universell einsetzbarer Expressionsvektor, insbesondere für die Produktion der Glycoproteine gp250/350, in eukaryotischen Zellen läßt sich nicht verwirklichen. Zum einen ist die Promotor- und Enhancer-Wirkung der retroviralen LTR-Sequenz wohl für die stark reprimierten viralen Promotoren zu gering. Es können also nur translatierbare Transkripte entstehen, wenn in der LTR-Sequenz gestartet wird und vor dem fremden Gen 'splicing' (wie eventuell bei EBNA-1) stattfindet, oder bei einem konstitutiv transkribierten Promotor (wie es eventuell noch bei der Expression des Hepatitis B sAg mit pMSV in 3T3 der Fall war; Stratowa et al., 1982). Aus diesem Grund wurde ein anderes Expressionssystem gewählt, das die definierte Integration fremder Gene hinter einen konstitutiv translatierten Promotor (SV40 early promoter) erlaubt. Außerdem wurde ein anderes Selektionssystem (dhfr) benutzt, da die Verwendung aktiver oncogener Sequenzen für die Gewinnung medizinisch einsetzbarer Substanzen zumindest fraglich wäre. Für dieses Expressionssystem wurde ein Vektor konstruiert, der neben einem Selektionsmarker die Transkription der Glycoprotein-kodierenden Sequenzen vermittelt. Als Selektionsmarker wurde das Dihydrofolat-Reduktase Gen (dhfr) verwendet, das ein Wachstum von dhfr-negativen 'Chinese hamster ovary' (CHO)-Zellen erlaubt (Chasin und Urlaub, 1982).

Die Dihydrofolat-Reduktase ist ein essentielles Enzym bei der Synthese von Thymidin. Deshalb erfolgt Selektion für dhfr-Rekombinanten im Medium, das absolut frei von Nukleotiden ist, so daß nur Zellen wachsen können, die in der Lage sind, eine Neusynthese von Nukleotiden zu machen.

2.2.1. Konstruktion des Expressionsvektors pMDIIGP

Das Plasmid leitet sich im wesentlichen aus drei Vorläufer-Plasmiden ab:

- 1) Von pSVE stammen pBR322-Sequenzen (Replikationsursprung, β -Lactamase Gen), die für die Konstruktion und Vermehrung in Bakterien notwendig sind. Zusätzlich wurde von pSVE der SV40 'early' Promotor sowie eine β -Globin 'splice' Donor und Akzeptor Sequenz verwendet, die für die Transkription der EBV-Sequenz zuständig sein sollten (Breathnach und Harris, 1983).
- 2) Die kodierende Region für gp250/350 wurde von EBV-BamHI-L isoliert. Wichtig dabei war, daß der Anfang der Sequenz mit möglichst wenig 5'-nicht-kodier-

enden Nukleotiden (aber mit dem Translationsstart) kloniert wurde. Der vergebliche Expressionsversuch im 3T3-System legt den Schluß nahe, daß die Transkription dieses Gens stark reguliert ist.

3) Der dhfr-Selektionsmarker stammt von Plasmid pAdD26SV, bei dem die Transkription der DHFR-kodierenden Region von dem Adenovirus 'major late' Promotor mit SV40 'enhancer' Region erfolgt (Kaufman und Sharp, 1982a). Da nach dem Transkriptionsstart eine 'splice' Donor-Sequenz auftritt, ist zwischen Promotor und DHFR-kodierender Sequenz noch ein 'splice' Akzeptor-Signal aus der variablen Region eines Immunglobulins eingefügt (Bothwell et al., 1981). Terminiert wird das Transkript durch die SV40 'early' mRNA Polyadenylierungsstelle.

Die Konstruktion des Vektors pMDIIGP aus den drei Plasmiden ist in Abb.35 schematisch dargestellt. Der 5'-terminale Bereich des gp250/350-Gens wurde als 230bp-MnII-'blunt end'-Fragment von BamHI-L isoliert und in die HincII Stelle von pUC12 integriert. Ein resultierendes Plasmid, pUCLM1, enthielt das EBV-Fragment in der gleichen Transkriptionsrichtung wie lacZ α Gen von pUC, d.h. vor dem Translationsstart von gp250/350 sitzen nun die Restriktions-schnitt Stellen für EcoRI, BamHI und XbaI.

Wie aus Abb.35 zu sehen, wurde die restliche kodierende Region als 600bp-EcoRI- und 2661bp-HindIII/HincII-Fragmente isoliert und miteinander kombiniert. Das aus diesen Schritten resultierende Plasmid pUC18GP enthält nun das gesamte gp250/350-Gen mit der Polyadenylierungsstelle, die 5bp nach dem Translationsstop lokalisiert ist. Die 3'-untranslatierte Region bis zur HincII-Stelle ist 225bp lang. Nach Ligation dieses HincII-Endes mit pUC18 wird eine Sall-Stelle generiert, da die EBV-Sequenz mit GTC endet und die pUC18 HincII Stelle auch eine Sall Stelle (GTCGAC) ist.

Bei der Klonierung des 3'-MnII-Fragmentes hätte ebenfalls eine Sall-Stelle generiert werden sollen. Die Hälfte der Erkennungssequenz wird von der HincII Schnittstelle beigesteuert (GTC), die EBV-Sequenz sollte mit GAC starten, so daß wieder ein Sall-Stelle entstehen sollte. Dies wurde jedoch nicht gefunden, und deshalb mußte die Sequenz des gp250/350-Starts bestimmt werden. Die Sequenzanalyse wurde an einem m13-Klon gemacht, der ein ca. 400bp großes HindIII-Fragment (Abb.35) trug (freundlicherweise von P.Heinrich, Institut für Biochemie, München, durchgeführt). Sie ergab folgendes Bild:

pUC-Vektor-----GGATCCTCTAGAGTC / ACAATG-----gp250/350

Der Übergang vom pUC-Polylinker (gezeigt von BamIII) zur gp250/350-Sequenz ist durch einen Schrägstrich angezeigt.

Anstatt wie aufgrund des MnII-Schnittes zu erwarten war, lautet der Start

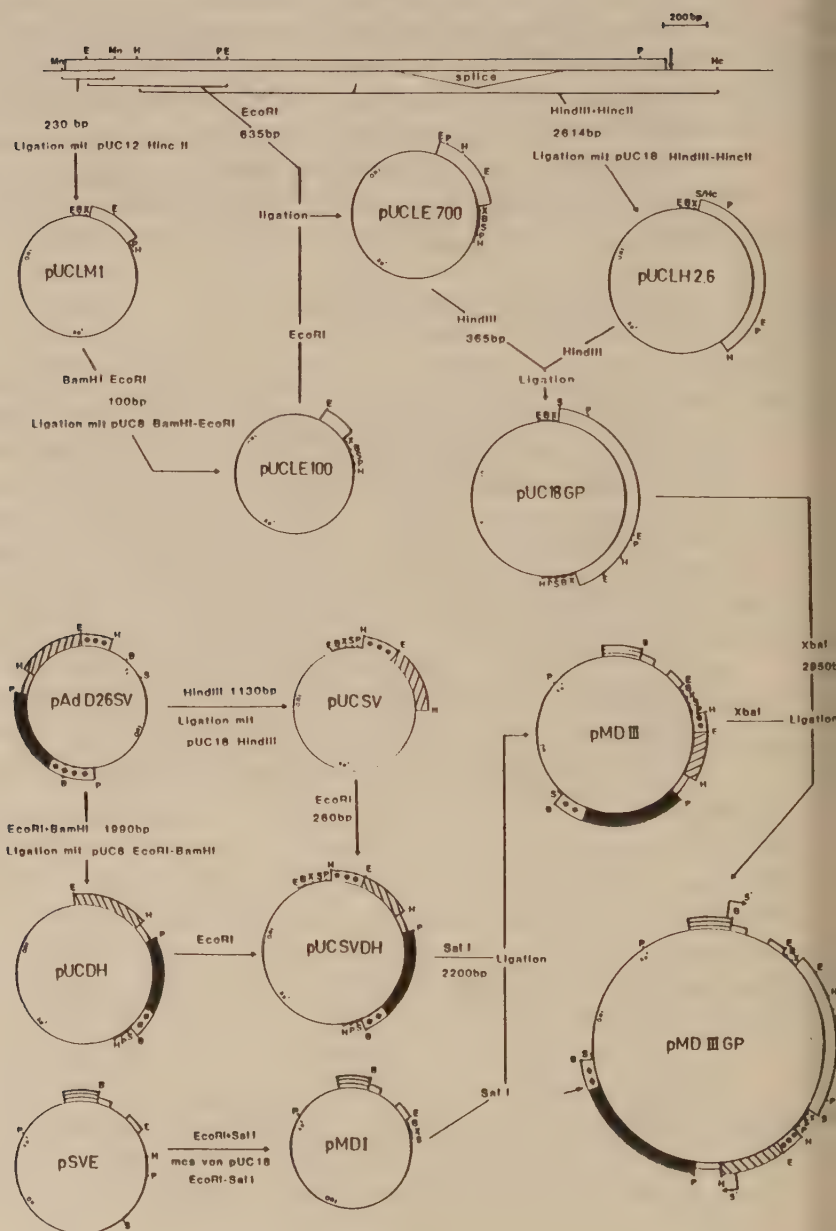
der gp-kodierenden Sequenz nicht GACAATG, sondern es fehlt das erste Guanin. Da diese Deletion den Translationsstart nicht betrifft, wurde dieses Konstrukt trotzdem verwendet.

Um ein einfaches Klonieren des dhfr-Gens mit seinen Regulationssequenzen zu ermöglichen, wurde die Sequenz in pUC-Plasmiden neu konstruiert, so daß das gesamte Gen mit einem Sall-Schnitt als 2.4kb-Fragment isoliert werden kann (pUCSVDH). Dieses Segment wurde mit dem Plasmid pSVE kombiniert, in das der pUC18 Polylinker (von EcoRI bis Sall) inseriert worden war. In einem letzten Schritt erfolgte noch das Einsetzen des 2950bp-XbaI Fragments von pUC18GP mit der Glycoprotein-kodierenden Sequenz hinter den SV40 'early' Promotor und den 'splice' Sequenzen (pMDIII^{GP}, Abb.35).

2.2.2. Transfektion von CHO-Zellen

Mit Hilfe von Kalzium-Phosphat/DNA Präzipitaten (Graham und van der Eb, 1973) wurden die Plasmide pMDIII^{GP} und pMDIII (als Kontrolle) in dhfr⁻ CHO Zellen (Chasin und Urlaub, 1980) transfiziert. Nach der Selektion in Medium ohne Nukleotide erschienen in beiden Fällen nach 10 bis 14 Tagen Zellkolonien in den Platten, wobei die Zahl der pMDIII^{GP}-transformierten Klone deutlich geringer war. Die Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pMDIII transfiziert worden waren, hatten ein normales Wachstumsverhalten und konnten ohne Probleme von der Platte isoliert werden. Dagegen zeigten Kolonien aus der Transfektion mit pMDIII^{GP} ein sehr langsames Wachstum und die meisten starben nach dem Erreichen einer Kolonigröße von 100-200 Zellen wieder ab. Nur einige wenige Klone konnten von den Platten isoliert und in größerem Maßstab herangezogen werden. Nach einigen Passagen erreichten diese Klone schließlich auch eine normale Teilungsrate.

Abb.35, Legende siehe nächste Seite



Legende Abb.35. Konstruktionsschema von pMDIIIIGP.

Ausgangsvektoren waren dabei:

1) BamHI-A (oberer Bildrand); gezeigt ist nur die gp250/350-kodierende Region (offenes Segment) mit den benutzten Restriktionsenzym Stellen; 'splice' fehlender Transkriptteil bei gp250; Pfeil, Polyadenylierungsstelle;

2) pAdD26SV (Mitte links);

3) pSVE (unten links)

BamHI-A wurde mit MnlI verdaut, eine 230bp-Bande isoliert und in die HindIII-Stelle von pUC12 inseriert (pUCLM1). Von diesem Plasmid erfolgte die Isolierung eines 100bp-EcoRI/BamHI-Fragments mit dem 5'-Bereich von gp250/350 und Insertion in pUC8 (pUCLE100). Nach Linearisierung mit EcoRI wurde in dieses Konstrukt das 600bp-EcoP'-Fragment aus BamHI-A inseriert (pUCLE700). Das 2614bp-HindIII/HincII-Fragment mit dem restlichen gp-kodierenden Bereich sowie ca. 230bp 3'-nicht-translatierter Sequenz wurde in die HincII- und HindIII-Stellen von pUC18 inseriert (pUCLH2.6). Nach Linearisierung von pUCLH2.6 mit HindIII erfolgte die Insertion des 400bp-HindIII-Fragments von pUCLE700 mit dem gp-Start (pUC18GP). Dieses 400-bp HindIII-Fragment wurde auch in den m13-Phagen für die Sequenzanalyse kloniert.

pAdD26SV wurde mit HindIII verdaut, das entstehende 1130bp-Fragment in pUC18 inseriert (pUCSV) und ein 230bp-EcoRI-Fragment davon wieder isoliert. Mit dieser Prozedur wird erreicht, daß sich vor der HindIII-Stelle nun die gesamte pUC18 multiple Klonierungssequenz befindet.

Weiterhin wurde von pUCAdD26SV ein 1990bp-Fragment nach EcoRI und BamHI Verdau isoliert. Diese Sequenz mit dem Ad2-Promotor, "splice" Akzeptor Stelle, dhfr-Gen und SV40-Polyadenylierungsstelle wurde in pUC8-EcoRI/BamHI inseriert (pUCDH) und anschließend mit EcoRI linearisiert. Durch Einsetzen des 230bp-EcoRI-Fragments aus pUCSV in der ursprünglichen Orientierung entsteht pUCSVDH, von dem die dhfr-Sequenz samt Transkriptions-Regulations Sequenzen mit Sall isoliert werden kann. "

pSVE wurde mit EcoRI und Sall verdaut und in die verbleibenden Vektorsequenzen die multiple Klonierungsstelle von pUC18 (EcoRI-Sall) inseriert (pMDI). Nach Linearisierung mit Sall erfolgte die Insertion des 2.4kb-dhfr-Fragments in einer Orientierung, daß die Transkriptionsrichtung von SV40- und Ad2-Promotor gleich sind. Nach erneuter Linearisierung wurde schließlich noch das 2950bp-XbaI-Fragment von pUC18GP inseriert (pMDIIIIGP, ca. 9.8kb). ORI, Replikationsursprung von pBR322 und pUC-Vektoren, Ap^r, β -Lactamase-Gen; X, XbaI; S, Sall; P, PstI; H, HindIII; Mn, MnlI; Hc, HincII; Segment mit Punkten, SV40 'enhancer' Sequenz; Segment mit schräger Schraffierung, Ad2 'major late' Promotor; dünnes offenes Segment, 'splice' Sequenzen, vor gp250/350-Gen: β -globin 'splice' Donor und Akzeptor (Intron als Linie), vor dhfr-Gen: 'splice' Akzeptor von einer variablen Region eines Immunglobulin Gens; schwarzes Segment, dhfr Gen; Segment mit Rauten, SV40 Polyadenylierungsstelle; Segment mit waagrechtter Schraffierung, SV40 'early' Promotor.

Außer BamHI-A am oberen Rand ist die Zeichnung nicht maßstabsgetreu; bei pMDIIIIGP sind die eukaryotischen Transkriptionsstarts und Polyadenylierungsstellen mit 5' bzw. 3' und Pfeilen gekennzeichnet.

2.2.3. Nachweis von gp250/350 in den dhfr⁺ CHO-Zellen

Vier Zellklone aus der Transfektion mit pMDIIIGP wurden in einem Immunfluoreszenz-Test auf die Anwesenheit von EBV-MA in ihren Membranen untersucht. Die Zellen wurden in kleinen Schalen gezogen und dann mit einem monoklonalen Antikörper gegen gp250/350 inkubiert. Nach dem Abwaschen erfolgte der Nachweis von gebundenen Antikörpern durch Zugabe von Peroxidase-konjugierten Anti-Maus IgG-Antikörpern und Peroxidase-Reaktion. Da die Zellen zuvor nicht fixiert worden waren und damit intakt bleiben, konnte eine Antikörperbindung nur auf den Oberflächen stattfinden. Das Ergebnis ist in Abb.36 gezeigt; zwei der vier pMDIIIGP transfizierten Klone zeigen eindeutig eine Membranfluoreszenz, die auf eine Expression und Lokalisation von gp250/350 in den Membranen schließen läßt.

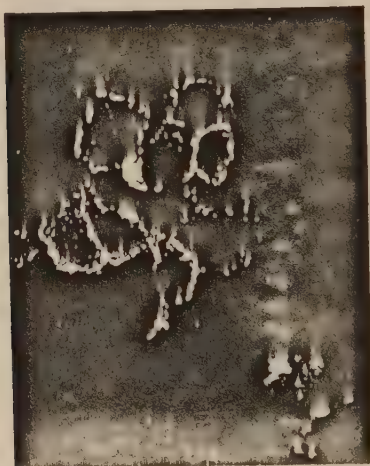


Abb.36 Expression von gp250/350 in CHO-Zellen; Nachweis durch Immunfluoreszenz.

dhfr⁺ CHO-Zellen in kleinen Zellkulturschalen wurden bei 0°C mit dem monoklonalen, anti-gp250/350 Antikörper 64D7 (von W.Jilg zur Verfügung gestellt) inkubiert und gebundene Antikörper mit FITC-konjugiertem anti-Maus IgG Kaninchen-Antikörper und UV-Licht im Mikroskop nachgewiesen.

Die Fluoreszenz tritt besonders an den Zellgrenzen auf, da bei einer Betrachtung von oben vertikal zum Betrachter stehende Membranbereiche mit einbezogen sind.

Es hat den Anschein, als ob die EBV-Membranproteine nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern sich zusammenlagern.

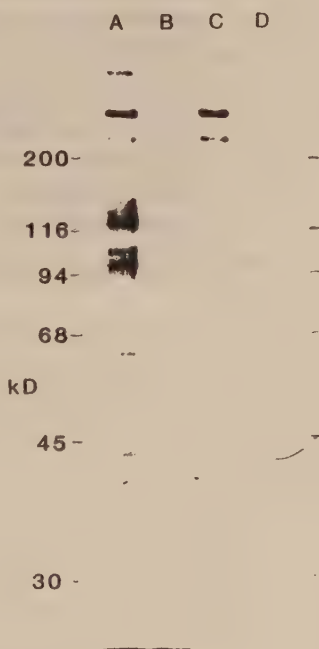
Bei dem Kontrollansatz mit CHO-Zellen war keine Reaktion zu beobachten (nicht gezeigt).

Einer dieser positiven Klone wurde durch [125 I] Oberflächen-markiert und lösliche Membranbestandteile durch Nonidet P-40 (NP40)-Behandlung herausgelöst. Nach SDS-PAGE Analyse und Autoradiographie sind deutlich zwei Proteine in dem erwarteten Molekulargewichts-Bereich von 250-350kDa zu erkennen (Abb.37). Die beiden Proteine lassen sich durch den in der Immunfluoreszenz verwendeten monoklonalen Antikörper gegen gp250/350 präzipitieren, aber nicht durch einen anti-p150 monoklonalen Antikörper. Dieser Test ist die Bestätigung für die korrekte Expression und Lokalisation in den Membranen.

Abb.37 Expression von gp250/350 in CHO-Zellen; Nachweis durch Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper gegen gp250/350

SDS-12.5% PAGE von einem [125 I]-Oberflächen-markierten CHO Klon, der positiv in der Immunfluoreszenz war.

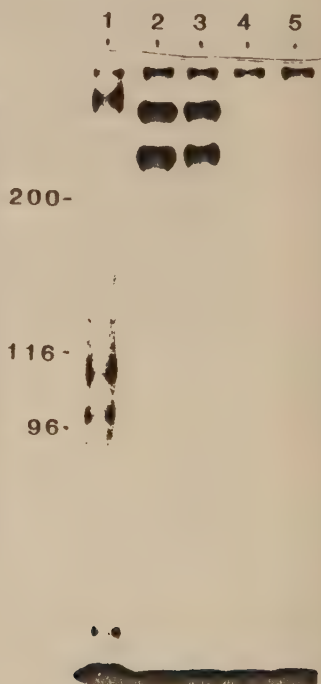
- A) Aliquot eines NP40-Extrakts der markierten Zellen;
- B) Aliquot der NP40-unlöslichen Zellbestandteile;
- C) Immunpräzipität des NP40-Extrakts mit anti-gp250/350;
- D) Immunpräzipität des NP40-Extraktes mit einem monoklonalen Antikörper gegen p150 (VCA).



Die Reaktivität dieser Expressionsprodukte mit menschlichem Serum und der Größenvergleich mit den authentischen gp250/350 von B95-8-Zellen ist in Abb.38 zu sehen. Die Proteine von den CHO-Zellen werden sehr gut von dem NPC Serum erkannt, haben aber ein etwas kleineres Molekulargewicht als gp250/350 von B95-8. Dies könnte durch ein etwas verändertes Glycosylierungsmuster der CHO-Zellen bewirkt werden. Das Mengenverhältnis der beiden Glycoproteine ist in den CHO-Zellen nahezu gleich, im Gegensatz zu den B95-8-Zellen, wo fast ausschließlich die größere gp350-Komponente produziert wird.

Abb.38 Vergleich von authentischen gp250/350 mit den rekombinanten Proteinen aus CHO-Zellen hinsichtlich Größe und Reaktivität mit NPC-Serum. 7.5%-SDS PAGE und Autoradiographie von Immunpräzipitationen mit NPC-Serum-Pool von NP40-Extrakten aus [125 I]-Oberflächen markierten Zellen.

- 1) B95-8-Zellen
- 2) CHO/pMDIIGP-1
- 3) CHO/pMDIIGP-2
- 4) CHO
- 5) EBV-negative BJA-B-Zellen.



2.2.4. Nachweis von EBV-spezifischen DNA-Sequenzen und Transkripten in den gp250/350⁺-Zellen

Die Organisation der transfizierten pMDIIIIGP-Sequenzen wurde durch einen Southernblott von Restriktionsenzym-verdauter Zell-DNA und Hybridisierung mit [³²P]-markiertem pMDIIIIGP untersucht (Abb.39). Das komplexe Muster von spezifischen Banden ist das Ergebnis der Rekombination in das Genom an mehreren verschiedenen Stellen. Daneben lassen sich aber immer die bei dem jeweiligen Enzymverdau erwarteten gp250/350- und DHFR-kodierenden Sequenzen finden. Mit einem Northern Blot von zytoplasmatischer RNA und Hybridisierung mit [³²P]-markierten pUC18GP wurden EBV-spezifische Transkripte nachgewiesen (Abb.40). Als Kontrolle wurden dabei RNAs von negativen CHO-Zellen, von B95-8-Zellen und von PH3R1-Zellen mitgeführt. In beiden CHO-Klonen hybridisieren zwei Transkripte von 2.6 und 3.2, die damit über 100nt mehr besitzen als die authentischen mRNAs aus B95-8-Zellen (Beisel et al., 1985). Dies dürfte auf die unterschiedlichen 5' nicht-translatierten Sequenzen zurückzuführen sein (siehe Diskussion). Das Verhältnis der beiden Transkripte in den verschiedenen Zellen entspricht dem der Proteine: Bei den CHO-Zellen wird ein gleiches Verhältnis von gp250 und gp350 gefunden, dagegen besitzen B95-8-Zellen fast nur die gp350-Komponente.

Bei-P3HR1 Zellen wird der Großteil der gp250/350-kodierenden mRNA in das 2.5kb-Transkript prozessiert, als Folge davon produzieren diese Zellen auch fast nur die gp250-Komponente (Edson und Thorley-Lawson,1981).

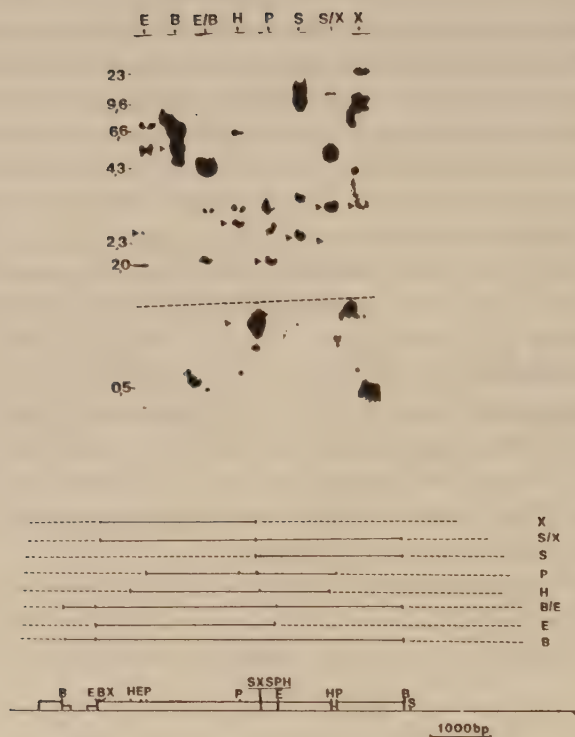


Abb.39 Nachweis pMDIIGP-spezifischer Sequenzen in CHO [pMDIIGP-1]. Der Southern Blot mit je 10µg chromosomaler DNA, verdaut mit den oben angegebenen Restriktionsenzymen, wurde mit [32 P]-markiertem pMDIIGP für 20h hybridisiert, gewaschen und für 2 Tage autoradiographiert. Der unter der gestrichelten Linie liegende Bereich wurde für 7 Tage exponiert. E, EcoRI; B, BamHI; H, HindIII; P, PstI; S, Sall; Größenstandard am linken Rand in kb. Im unteren Teil ist die pMDIIGP-Sequenz linear (siehe Abb.35) gezeigt, sowie darüber die entstehenden Fragmente die bei vollständiger Integration entstehen müssen (durchgehende Linie). Diese Fragmente sind im Autoradiogramm mit Dreiecken gekennzeichnet. Gestrichelte Linien bezeichnen Sequenzen, deren Größe aufgrund von benachbarten, zellulären Bereichen nicht bestimmt werden können.

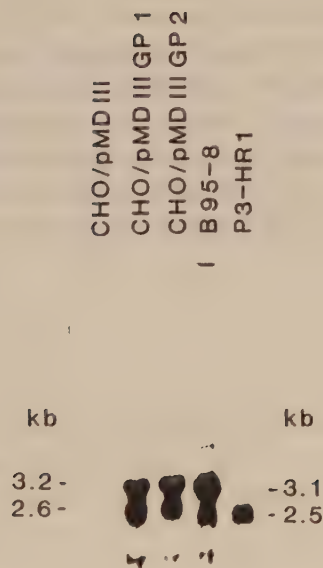


Abb.40 Nachweis gp250/350-spezifischer Transkripte in den rekombinanten CHO-Klonen und Größenvergleich mit authentischen mRNA's
Der Northern Blot mit zytoplasmatischer RNA wurde mit [32 P]-markierten pUC18GP für 20h hybridisiert, gewaschen und für 5 Tage autoradiographiert.
Für den Größenvergleich wurden mRNAs aus B95-8 und P3HR1 mit aufgetragen.

2.2.5. Amplifizierung der gp250/350-Expression

Durch Zugabe von Methotrexat (MTX) in das Medium der positiven CHO-Klone wurde versucht, eine Amplifizierung der rekombinierten dhfr-Sequenzen und damit auch der gp250/350-kodierenden Regionen zu erreichen, was sich phänotypisch als Auswachsen einzelner Klone auf der Platte zeigen sollte. Dies wurde jedoch nie gefunden. Offensichtlich sind die CHO-Zellen mit gp250/350-Expression nicht in der Lage, diese Sequenzen zu amplifizieren.

2.3. Sekretion von gp250/350 aus CHO-Zellen

Die Menge an gp250/350 in den CHO-Zellen ist für eine einfache Präparation zu gering und eine Amplifizierung war nicht möglich. Deswegen wurde versucht, ein Konstrukt zu machen, das es den Zellen ermöglicht, die beiden EBV-Proteine nach Synthese auszuschleusen. Damit sollte der vermutete toxische Effekt der EBV-Glycoproteine auf die CHO-Zellmembranen umgangen werden und eine Amplifikation möglich sein. Ein weiterer Vorteil der Ausschleusung sollte eine einfachere Reinigung der Expressionsprodukte aus dem Medium anstatt aus Zellen sein.

2.3.1. Konstruktion von pMDIIGPTR

Die beiden EBV-Membranproteine besitzen vor ihrem C-terminalen Ende einen 23 Aminosäuren langen, hydrophoben Bereich, der die Transmembran-Region darstellt und zusammen in dem dahinter folgenden hydrophilen C-Terminus für die Verankerung des Proteins in der Zytoplasmamembran verantwortlich ist (Abb.17). Wie aus dieser Abbildung auch hervorgeht ist die PstI-Stelle, die für die Konstruktion von pUCLP1.9 oder pUCLXP390 verwendet worden ist, genau am Anfang des hydrophoben Bereichs lokalisiert. Diese Restriktionsenzymstelle wurde benutzt, um die Ankersequenz von der restlichen gp-kodierenden Region zu trennen.

In Abb.41 sind schematisch die dazu notwendigen Schritte gezeigt. Das Plasmid pUCLP1.9 mit dem C-terminalen Bereich von der EcoRI- bis zur PstI-Stelle wurde mit PstI/HindIII verdaut und der Oligoarginin-kodierende Linker von pUCARG601 (s. Abb.12) eingebaut. Da der Leseraster der gp-kodierenden Sequenz und des Oligonukleotids übereinstimmen, hat dies eine Fusion von fünf Argininen am C-Terminus zur Folge. Zusätzlich erfolgt die definierte Termination der Translation durch die zwei Stopcodons, die auf den Arginin-kodierenden Bereich folgen. Von dem resultierenden Plasmid, pUCARGLP1.9, wurde das gesamte Insert mit EcoRI und HindIII isoliert, in pINI1A1 inseriert, davon wieder mit EcoRI/BamHI ausgeschnitten und in pUC18 eingebaut (pUCARGLP1.91). Da pINI1A1 einen Polylinker mit der Restriktionsenzymfolge EcoRI, HindIII und BamHI besitzt, ist es durch diese Schritte möglich 3' der HindIII-Stelle eine BamHI-Stelle zu generieren, die eine Integration des EBV-Fragments in die EcoRI- und BamHI-Stellen von pUC18 zuläßt. Bei pUC18 liegt neben BamHI die SalI-Stelle (Abb.2), deswegen ist es nun möglich, das 3'-Ende der EBV-Sequenz

mit Sall auszuschneiden.

Von pUCARGLP1.91 wurde die C-terminale gp-Region als NcoI/Sall-Fragment isoliert und in die entsprechenden Stellen von pUC18GPS inseriert. (pUC18GPS ist durch Isolierung der gp-kodierenden Region aus pUC18GP mit BamHI/Sall und Integration in pUC18 entstanden. Auf diese Weise ist die zweite Sall Stelle am 3'-Ende des Gens eliminiert worden.)

Von dem resultierenden Plasmid pUC18GPTR wurde die gp-Sequenz mit XbaI/Sall isoliert und in pMDI inseriert. Im letzten Schritt erfolgte dann noch die Insertion der DHFR-kodierenden Sequenz als Sall-Fragment von pUCSVDII. Für die Transfektion wurde ein Plasmid verwendet, bei dem die dhfr-Sequenz in einer (-) Orientierung, relativ zu der von pMDIIGP, inseriert worden war (pMDIIGPTR). Auf diese Weise ist jetzt die SV40-Polyadenylierungsstelle 3' der dhfr-Sequenz unmittelbar neben der Glycoprotein-kodierenden Region. Bei SV40 werden die frühen (t-Antigen) und späten mRNAs in der Nähe des Replikationsursprungs in beiden Richtungen gestartet und auf der gegenüberliegenden Seite des Genoms (VP 1) terminiert. Das bedeutet, daß zwei Polyadenylierungs-Stellen in diesem Bereich mit unterschiedlichen Orientierungen beeinanderliegen (Reddy et al., 1987; Fiers et al., 1987).

In dem SV40 BclI/BamHI-Fragment (Nukleotidposition 2770 bzw. 2533), das für die Terminierung der dhfr-mRNA benutzt wird (early mRNA-polyA Stelle), liegt auch die polyA-Stelle für das späte Transkript mit der entgegengesetzten Orientierung. Da bei dem gp250/350-Konstrukt mit der Ankersequenz auch die natürliche Polyadenylierungsstelle entfernt worden ist, ist auf diese Weise ein Ersatz geschaffen worden.

2.3.2. Transfektion von pMDIIGPTR

Im Gegensatz zur Transfektion mit pMDIIGP wurde eine relativ hohe Ausbeute an Kolonien erzielt (ca. 30 pro µg Plasmid) und ein großer Prozentsatz davon konnte von den Platten isoliert werden. Ein Absterben der Zellen wurde nicht beobachtet.

Abb.41, Legende siehe nächste Seite

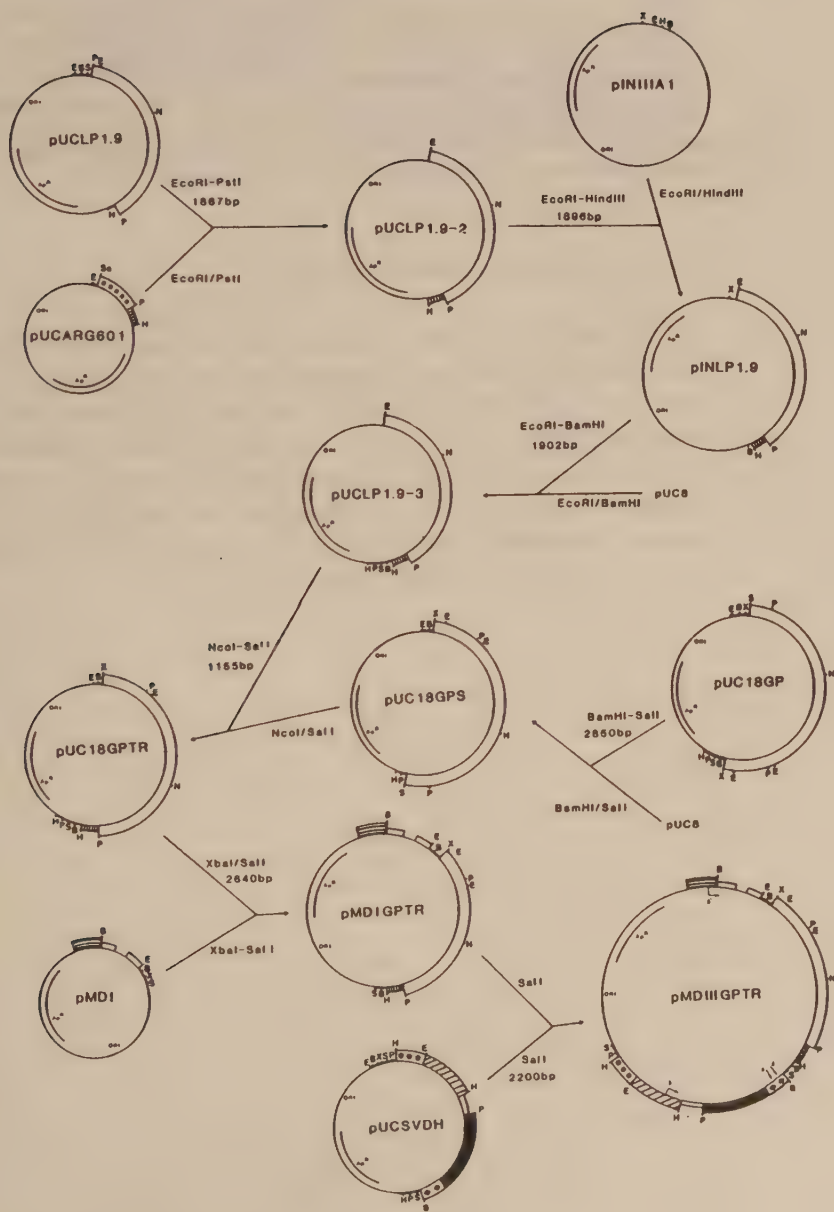


Abb.41. Konstruktion von pMDIIGPTR.

Die Herkunft der Ausgangsplasmide ist in folgenden Abbildungen zu sehen: pUCLP1.9, Abb.18; pUC ARG601, Abb.12; pUC18GP, Abb.35; pMDI und pUCSVDII, Abb.35.

Abkürzungen und Kennzeichnungen von Sequenzen wie Abb. 35; zusätzlich: N = NcoI; und Segment mit vertikal schraffiertes Segment, Oligonukleotid mit fünf Arginin- und zwei Stop-Codons, Sequenz siehe Abb.12; Segment mit schwarzen Quadraten, FR.IV aus p138 (Abb. 12).

Im Vergleich mit pMDIIGP (Abb.35) besitzt die Sequenz für das dhfr sowie dessen Regulationssignale die entgegengesetzte Orientierung. Dadurch liegt der SV40-Polyadenylierungsbereich für späte und frühe SV40 Transkripte (3' und Pfeile) unmittelbar nach dem gp250/350-kodierenden Segment.

2.3.3. Identifizierung des Expressionsprodukts

Die Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper gegen gp250/350 zeigte keine spezifische Reaktion mit den Zelloberflächen von verschiedenen isolierten CHO-Klonen. Deshalb wurden die Überstände dieser Kulturen untersucht. Nach Einengen des Volumens durch Ammonsulfatfällung (70% Sättigung) und Auftrennung durch SDS-PAGE sind die zwei spezifisch Banden mit 250 kDa und 350kDa nach Western Blot und Immunfärbung nachweisbar (Abb.42). Das bedeutet, daß die Glycoproteine ohne den Verankerungsteil von den CHO-Zellen stabil translatiert und ins Medium sezerniert werden.

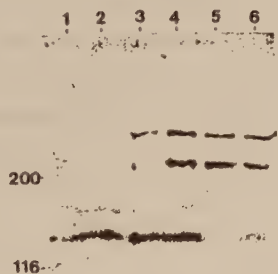
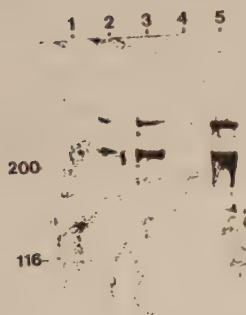
Abb.42 Nachweis von gp250/350 im Überstand von drei CHO-Klonen mit gp250/3 spezifischen Transkripten (Abb. 42)

links: Western Blot und Immunfärbung eines 7.5%-SDS PA Gels mit je 300µl Kulturüberstand, gefällt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70% Sättigung).

- 1) CHO-Zellen (negative Kontrolle);
- 2) CHO [pMDIIGPTR-2];
- 3) CHO [pMDIIGPTR-20];
- 4) CHO [pMDIIGPTR-21];
- 5) CHO [pMDIIGPTR-20], amplifiziert mit 10µM MTX.

rechts: Ammonsulfat-Löslichkeit von gp250/350 ohne Ankersequenz;

Fällung mit: 1) 45%-; 2) 50%-; 3) 55%-; 4) 60%-; 5) 65%-; 6) 70%-(NH_4)₂SO₄-Sättigung.



2.3.4. Nachweis EBV-spezifischer Transkripte

Analog zu den pMDIIGP-transfizierten CHO-Zellen wurde von einigen Klonen zytoplasmatische RNA isoliert und nach Northern Blot mit [32 P]-markiertem pUC18GP hybridisiert.

Das Ergebnis der RNA-Analyse ist in Abb.43 gezeigt. Es ergeben sich wiederum zwei Transkripte von 2.6 und 3.3kb wie bei dem pMDIIGP Klon. Die Termination durch die SV40 'late' Polyadenylierungsstelle funktioniert, da hier das Transkript nur unwesentlich länger als bei der natürlichen Termination wird.

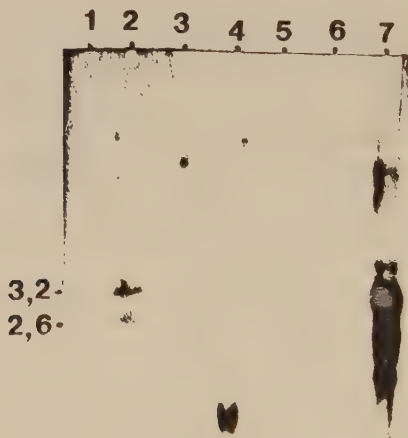


Abb.43 Nachweis gp250/350 spezifischer Transkripte in CHO-Zellen transfiziert mit pMDIIGPTR

Der Northern Blot mit zytoplasmatischer RNA wurde mit [32 P]-markierten pUC18GP für 20h hybridisiert, gewaschen und für fünf Tage autoradiographiert.

1) CHO, negative Kontrolle;

2-6) dhfr⁺ CHO-Klone aus Transfektion mit pMDIIGPTR;

7) B95-8-RNA, positive Kontrolle.

2.3.5. Amplifikation

Im Gegensatz zu den CHO-Klonen mit Membran-verankerten Glycoproteinen war eine Amplifikation der transfizierten Sequenzen bei diesen Klonen erfolgreich. Abb.42, Spur 5 zeigt die Expressionsausbeute eines CHO-Klons (20) im Vergleich mit den Ausgangszellen. Nach Selektion mit 10uM MTX starb ein Großteil der Zellen ab und nach 10 Tagen bildeten sich einzelne Kolonien, die hochgezogen und auf gp250/350-Expression getestet wurden. Aufgrund der Intensität der Banden läßt sich schätzen, daß ca. 10mal mehr als beim Ausgangsklon produziert wird. Weitere Amplifizierungsstufen, sowie der Nachweis einer Erhöhung der Kopienzahl und Transkripte sind in Gang.

Durch die Sekretion der EBV-Proteine ist ihre Reinigung wesentlich erleichtert, da nur Proteine des fötalen Kälberserums abgetrennt werden müssen. Ein weiterer Vorteil ist die relativ gute Löslichkeit bei der Ammoniumsulfat-fällung. Erst ab Konzentrationen von ca. 60% Sättigung werden die Glycoproteine präzipitiert (Abb.42). Ein Großteil der Mediumproteine, insbesondere Albumin, wird dagegen schon bei niedrigeren Konzentrationen gefällt.

D. Diskussion

Aufgrund des Fehlens eines lytischen Zellsystems für die einfache Gewinnung von Antigenen werden EBV-korrelierte Krankheiten serologisch immer noch mit indirekter Immunfluoreszenz an ganzen Zellen bei Auswertung unter dem Mikroskop nachgewiesen. Dies ist zeitaufwendig, nicht sehr sensitiv, teuer und erfordert geschultes Personal, da Reaktionen mit zellulären Bestandteilen auftreten.

Besonders bei groß angelegten, serologischen Kontrollen in den NPC-Hochrisiko Gebieten muß die anti-EBV Titerbestimmung mit Maschinen-lesbaren Testen (ELISA) vor sich gehen. Dies setzt aber eine große Menge an definierten, reinen EBV-Antigenen voraus.

Da die Produktion aus dem natürlichen System nicht effektiv ist, bleiben grundsätzlich zwei Möglichkeiten: die chemische Synthese kleiner Peptide von immunogenen Proteinregionen und die gentechnologische Produktion in anderen Zellsystemen. Verschiedene Peptide von einigen EBV-Proteinen werden zur Zeit in der Arbeitsgruppe synthetisiert und zum Teil auch mit recht gutem Erfolg im ELISA verwendet. Dennoch erscheint es fraglich, ob Peptide für Routine-tests einsetzbar sind. Einmal sind die Produktionskosten relativ hoch, was speziell in Ländern der Dritten Welt eine entscheidende Einschränkung sein könnte. Zum Zweiten erscheint die Spezifität fraglich, da bei Proteinen mehrere antigene Epitope vorhanden sein können (siehe p138), oder antigene Regionen aus einer dreidimensionalen Struktur bestehen können.

Die gentechnologische Herstellung der EBV-Antigene in Bakterien hat demgegenüber den Vorteil, daß nach Konstruktion der Expressionsplasmide das Antigen mit minimalen Kosten produziert werden kann. Für die Verwendung im ELISA ist keine 100%ige Reinheit erforderlich, so daß in den meisten Fällen ein relativ einfaches Reinigungsprotokoll genügt. Im Gegensatz zur Peptidsynthese können durch bakterielle Expression größere Bereiche der Antigene produziert oder auch fusioniert werden, und dadurch eine bessere Anpassung an das native EBV-Protein erzielt werden.

Bei den in E.coli produzierten EBV-Proteinen wurde nach einem allgemeinen Schema vorgegangen: zuerst wurde versucht, möglichst den gesamten kodierenden Bereich zu exprimieren. Dies hatte jedoch nur bei p54 Erfolg. Bei den großen EBV-Proteinen wurde mit Hilfe des Computers nach möglichen antigenen Stellen gesucht, diese Regionen subkloniert und exprimiert. Da der Wert der Vorhersage

zu Beginn nicht gesichert war, wurde jeweils die gesamte kodierende Sequenz subkloniert und nach Expression als β -Gal Fusionsproteine auf Antigenität mit dem NPC-Serum-Pool überprüft. Anschließend wurden antigene Segmente als Nichtfusionsproteine exprimiert und im Falle von Instabilität mit anderen fusioniert.

Bei der prokaryotischen Expression wurden Plasmide verwendet, die entweder den lac-Promotor (pUC-, pUR-Plasmide) oder tac-Promotoren (pMFI, pKK240-11) trugen. pUC- und pUR-Vektoren besitzen eine Vielzahl von Restriktionsenzym-Schnittstellen, was die Insertion von Segmenten im richtigen Leseraster mit den lacZ-Transkripten sehr erleichtert.

Allerdings treten bei der Überproduktion eukaryotischer Proteine in Bakterien allgemein Probleme auf. Große Proteine werden nur in geringem Ausmaß produziert, sind teilweise instabil und werden meist als unlösliche Konglomerate an der Zellmembran abgelagert. Durch Verkleinerung des Expressionsprodukts mit den essentiellen antigenen Regionen steigt zwar bei bestimmten Segmenten die Expressionsausbeute drastisch an, aber die meisten werden sofort nach Synthese wieder degradiert.

Bei den auf Antigenität getesteten Segmenten der drei Proteine (p138, p143 und gp250/350) ergibt sich durch Vergleich der experimentellen Befunde mit den Vorhersagen eine Bestätigung der Aussagekraft des Computerprogramms für immunogene Regionen von Proteinen. Dabei muß allerdings immer unterschieden werden zwischen möglichen antigenen Strukturen und immunogenen Bereichen. Aufgrund der Berechnung lassen sich antigene Strukturen vorhersagen; also Bereiche, die in der Lage sein sollten, eine Immunantwort hervorzurufen. Diese Antwort ist gegen die isolierte Struktur gerichtet, was noch nicht bedeuten muß, daß im nativen Protein dieser Bereich erkannt wird. Bei immunogenen Regionen dagegen handelt es sich um Strukturen des nativen Proteins, gegen die nach Immunisierung Antikörper gerichtet sind. Die Stärke dieser Immunantwort gegen verschiedene Bereiche kann individuell differieren, wie z.B. bei den getesteten NPC-Seren, die bei p138 unterschiedliche Reaktivität gegen zwei Epitope zeigten (Abb.14).

Bei EBNA-1, p138 und gp250/350 waren die vorhergesagten Regionen auch immer die haupt-immunogenen Bereiche; dagegen zeigt bei p150 das von DTT790 kodierte Segment trotz hydrophiler β -turns keine Reaktion mit dem NPC-Serum. Der β -turn Bereich um Aminosäure 490 besitzt neun positiv geladene Reste in einem 15aa langen Stück, welches deswegen eventuell eine Bindungsstelle für DNA im Kapsid darstellen könnte. Damit wäre einerseits eine Lokalisation im Inneren des Kapsids Voraussetzung und andererseits eine Abdeckung der antigenen

Region durch DNA gegeben. Beides würde die Präsentation dieses Bereiches im nativen Protein oder viralen Kapsid verhindern.

Abgesehen von dieser Einschränkung scheint dieses Programm jedoch universell für die gezielte Expression immunogener Segmente von großen eukaryotischen Proteinen verwendbar zu sein. Aufgrund der Erfahrungen bei den drei getesteten Proteinen läßt sich folgern, daß in den meisten Fällen Strukturen mit den stärksten hydrophilen β -loop Bereichen auch die besten immunogenen Regionen des nativen Proteins darstellen.

Zusätzlich wurde dieses Programm noch bei einer Reihe von weiteren Proteinen überprüft, deren antigene (Oberflächenlokalisation) oder immunogene Bereiche aufgrund von Analysen mit synthetischen Peptiden und Röntgenstruktur Berechnungen bekannt sind. In nahezu allen Fällen zeigte sich eine gute Übereinstimmung von Computervorhersage (hydrophile β -loop Struktur) und den experimentell bestätigten Epitopen (B. Jameson und H.Wolf, Manuskript eingereicht). Das Programm ist inzwischen weiter verbessert worden. Anstatt zwei Parameter (Hydrophilizität und β -loop) zu kombinieren und auszuwerten, wird jetzt noch eine zweite Sekundärstruktur Vorhersage (Garnier und Robson, 1978), die Wahrscheinlichkeit für Lokalisation an der Oberfläche (Emini et al, 1985), sowie der Wert für Flexibilität (Karplus und Schulz, 1985) mit eingeschlossen. Aus der Kombination dieser Parameter ergibt sich ein Antigenitäts-Index, der mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit antigene Stellen und damit auch mit gewissen Einschränkungen immunogene Bereiche vorhersagt (B.Jameson und H.Wolf, Manuskript eingereicht).

p138

Bei p138 mußte der genaue ORF durch Hybrid-selektionierte mRNA mit pUC635 und anschließender in-vitro Translation bestimmt und mit Sequenzdaten korreliert werden. Der ORF BALF2 kodiert für p138. In den EBV Genomen der Raji Zellen ist er teilweise deletiert. Diese Zellen sind nicht mehr in der Lage, das Virus zu produzieren; der Grund könnte im Fehlen des p138 liegen (Roubal et al., 1981). Es wird vermutet, daß p138 die Funktion eines DNA-Bindungs-proteins hat und bei der Replikation des viralen Genoms beteiligt ist. Dies erklärt vielleicht auch die Toxizität des Proteins für Bakterien. Die Expression von großen p138-Segmenten (pUC635, pUC924, pMF924 und pKK378) in JM83 nicht immer reproduzierbar, das Plasmid wies nach einigen Wachstumsphasen der Bakterien eine verringerte Größe auf, was auf Rekombinationen schließen läßt. p138 zeigt gute Aminosäure-Homologien zu ICP8 von HSV1 (Quinn und McGeoch, 1985), das ebenfalls ein DNA-Bindungsprotein ist. Bei der Expression von großen ICP8-Fragmenten in E.coli ergaben sich ähnliche Probleme,

wie etwa Absterben der Zellen und Rekombinationen des ICP8-Inserts im Plasmid (Pearson, R.E. et al., 1985). Diese Toxizität des p138 ist neben seiner geringen Produktionsrate ein zweiter Grund für die Expression von Proteinsegmenten.

In der Computergraphik für p138 lassen sich zwei Bereiche mit hydrophilen β -loop Strukturen ausmachen, deren Immunogenität durch β -Gal Fusionsproteine bestätigt ist. Die Reaktion mit dem C-terminalen Segment, kodiert von FR.VII (pUR540), ist nach Expression als β -Gal Fusionsprotein erheblich stärker als die des FR.IV-kodierten zweiten antigenen Segments (Abb.10).

Das korrespondierende pUC-kodierte FR.IV::lacZ α Protein reagiert jedoch sehr gut, was den Schluß zuläßt, daß durch die große β -Galaktosidase der C-terminal fusionierte p138-Teil teilweise verdeckt wird und die Antikörperbindung sterisch behindert wird. Bei dem FR.VII-kodierten Segment scheint dies nicht der Fall zu sein, die vermutete antigene Region sitzt ganz am C-terminalen Ende des FR.VII Segments und ist damit vom Fusionspunkt am weitesten entfernt.

Die β -Gal::p138-Proteine werden in sehr unterschiedlichen Mengen produziert (z.B. pUR400 und pUR380), daneben gibt es noch starke Schwankungen in der Verteilung von vollständig translatiertem Produkt, nur teilweisem bzw. β -Gal. Offensichtlich besitzt die jeweilige p138-Sequenz einen erheblichen Einfluß auf Transkription bzw. Translation.

Möglichkeiten dafür sind unvollständige Transkription bedingt durch Sequenzen, die von der E.coli-Polymerase als Terminationssignal erkannt werden; analoge Ereignisse sind bei der Translation der mRNA vorstellbar. Außerdem ist es möglich, daß die β -Gal die p138-Segmente nicht vollständig vor Degradation schützt (Stanley, 1983). Die unterschiedlichen Mengen an Fusionsprotein können durch Toxizität verursacht werden, wenn p138-Segmente in die Membran eingelagert werden oder noch biologische Aktivität besitzen (Bindung an DNA).

Die Stabilität des von pUCP600 (FR.IV) kodierten Segments aus dem mittleren Bereich von p138 ist vielleicht mit dem Vorhandensein von sehr vielen β -loop Strukturen zu erklären, die dem Expressionsprodukt eventuell eine sehr kompakte Form geben, die darüber hinaus noch hydrophil ist. Deswegen könnte es weniger anfällig für Proteasen sein.

Mit den sich davon ableitenden FR.IV-Konstrukten wie pUC601, pUCARG601, pUCARGNCO und pMF175 läßt sich der haupt-immunogene Bereich eingrenzen (Abb.13 und 44). Die Entfernung von neun Aminosäuren vom N-terminalen Bereich des Segments hat keinen Einfluß (pUC601), ebensowenig wie das Fehlen von 26 Aminosäuren vom C-Terminus (pMF175). Dagegen ist die Antigenität fast

völlig verschwunden, wenn durch den NcoI-Schnitt 74 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt werden (pUCARGNCO) (Abb.44).

Dies läßt den Schluß zu, daß ein essentieller Bereich für die Antikörpererkennung in dem zweiten hydrophilen β -loop Bereich um Aminosäure 550 liegt. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß der verbleibende β -loop Bereich bis Aminosäure 550 von Antikörpern nicht erkannt wird. Vielmehr scheint die Verkürzung des Proteinsegments eine Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur zu bewirken, die auch mit einer Veränderung der Erkennungsregionen einhergeht. (Eventuell bedingt durch das Fehlen der zwei β -Faltblatt-Bereiche zwischen aa 560 und 600.)

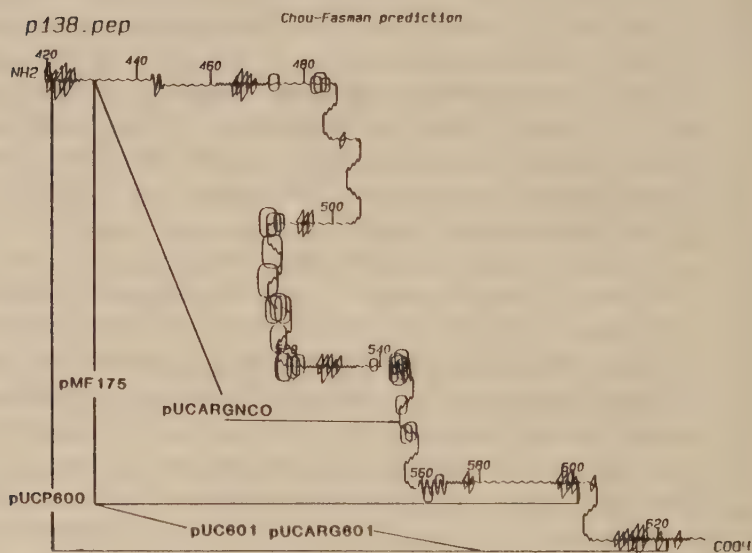


Abb.44 Eingrenzung des für die Erkennung durch Antikörper notwendigen immunogenen Bereichs des nativen p138.

Computer-Graphik der Sekundärstruktur-Vorhersage von p138 zwischen aa420 und aa630 mit β -Faltblattstruktur (~~~~~), nicht-definierten Bereichen (Zickzack) und β -turn Strukturen (Drehungen um 180°), sowie hydrophilen (Kreise) und hydrophoben (Rauten) Bereichen. Dargestellt sind noch die Proteinsegmente, die von den angegebenen Expressionsplasmiden kodiert werden.

Dasselbe Phänomen wurde auch bei der Expression des antigenen C-terminalen Fragments von gp250/350 gefunden. Als Fusionsprotein reagiert es sehr gut als Antigen, das Nicht-Fusionsprotein dagegen ist zwar noch stabil, aber der fehlende Fusionsanteil erlaubt dem Peptid nun offensichtlich eine andere Tertiär- und Sekundärstruktur, so daß es nicht mehr als Antigen reagiert. Die erfolgreiche Fusion (pUCARG1140) des stabil exprimierbaren FR.IV mit dem zwar immunogenen aber instabilen FR.IV-Segment zeigt, daß dieses Proteinsegment eventuell als universeller Fusionspartner bei der Expression kleiner eukaryotischer Proteinteile eingesetzt werden könnte. Dies wurde bei der Expression von gp250/350-Segmenten versucht; im Falle des 30kDa großen N-terminalen Bereichs (LEP600, Abb.20) konnte damit eine Stabilisierung und Steigerung der Expression erreicht werden (pUCARG1230, Abb.21), nicht jedoch bei der Fusion mit dem großen LP1.9-Fragment. Dies legt den Schluß nahe, daß nur Proteine bis zu einer bestimmten Größe von dem FR.IV-kodierten Segment stabilisiert werden können.

Die Antikörperbindung an das pUCARG1230-kodierte Protein ist relativ schwach, was durch eine andere sterische Konformation oder durch gegenseitige Abdeckung der Epitope bewirkt werden könnte. Antikörper aus Kaninchen, die mit diesem Protein immunisiert worden waren, erkennen hingegen sowohl p138 als auch gp250/350 (R.Seibl, persönliche Mitteilung). Das bedeutet, daß das Fusionsprotein nicht mehr besonders antigen für den NPC Serum Pool ist; aber auch, daß dieses Fusionsprotein trotzdem noch im Kaninchen immunogen ist, da die nativen Proteine wieder erkannt werden. Im Kaninchen sind Antikörper gegen Epitope gebildet worden, die bei einer Immunisierung mit dem gesamten Protein (NPC Serum) eine eher untergeordnete Rolle spielen; offensichtlich ist die Hauptantwort gegen Bereiche gerichtet, die aufgrund der Fusion der beiden Segmente entweder verloren gingen oder abgedeckt werden.

Die Fusion des zweiten antigenen p138-Segments vom C-Terminus (pUCARG1140) erbrachte das gewünschte Resultat: das Expressionsprodukt ist sehr stabil, es wird bis zu 20% des Gesamtproteins produziert. Beide haupt-antigenen Stellen werden unabhängig voneinander erkannt (Abb.14) und aus Abb.10 folgt, daß keine zusätzlichen immunogenen Stellen in p138 vorhanden sind. Das pUCARG1140-kodierte Produkt sollte demnach geeignet sein, als Antigen in serologischen Tests die Bandbreite der Antikörperreaktion gegen p138 abzudecken. Einschränkend ist, daß Antikörper gegen Tertiärstrukturen aus weit auseinanderliegenden Komponenten nicht gefunden werden können, aber im vorliegenden Fall auch nicht von Bedeutung sind.

Die Insertion des Oligo-Arginin kodierenden Linkers bei pUCARG1140 hatte für die Reinigung nicht den gewünschten Erfolg, da das Protein bei dem für die SP-Sephadex Chromatographie benötigten pH-Wert nicht in Lösung blieb. Obwohl zur Zeit an diesem Problem noch intensiv gearbeitet wird, sind inzwischen auch alternative Reinigungsprozeduren ausgearbeitet worden. Von anderen Mitgliedern der Gruppe sind etliche monoklonale Antikörper gegen das pUCARG1140 kodierte Produkt etabliert worden, die neben der Reaktivität gegen p138 entweder mit dem FR.IV- oder FR.VII-kodierten Segment (in pUR-Klonen) reagieren und die für die Reinigung mit einer Immunadsorptions-Säule benutzt werden sollen. Daneben gelang auch die Aufreinigung durch verschiedene Säulenchromatographien bis zu 92%.

Der in Abb.17 gezeigte ELISA-Test wurde jedoch noch mit einem nur zu ca.70% gereinigten Protein durchgeführt, was offensichtlich schon ausreichend für die Vermeidung von Hintergrundreaktionen ist. Hinzu kommt noch, daß IgA-Antikörper bestimmt werden, von denen normalerweise kein anti-E.coli-Titer vorhanden ist. Die Sensitivität im Vergleich mit der üblichen EA-Immunfluoreszenz ist erheblich besser. Die verwendeten Seren hatten in der Immunfluoreszenz anti-EA/IgA-Titer von höchstens 1:80, manche zeigten keine Reaktion. In Tab.3 sind die IgA-Titer von NPC-Seren bestimmt durch Immunfluoreszenz mit den ELISA-Titern verglichen.

Tab3. Vergleich von NPC-IgA/EA-Titern bestimmt mit Immunofluoreszenz-Tests an fixierten Zellen (IF, Zeng Yi, persönliche Mitteilung) und ELISA mit den gereinigten, pUCARG1140-kodierten p138-Segmenten.

	IF	ELISA
352	1:40	1:640
354	1:20	1:2560
359	1:8	1:10240
361	1:40	1:640
369	-	1:160
372	-	1:160
379	1:80	1:640
382	-	1:640
392	1:40	1:160
394	-	1:160

gp250/350

Der kodierende Bereich für gp250/350 war aufgrund von Translation hybrid-selektionierter mRNA und Sequenzdaten bekannt (Hummel et al., 1983, Beisel et al., 1985). Die Computervorhersage der antigenen Regionen bei gp250/350 erlaubte keine so eindeutige Zuordnung wie bei p138. Dies liegt wahrscheinlich an der sehr hohen Glycosylierung, die mehr als die Hälfte des Molekulargewichts ausmacht. Die Proteinanteile (nach in vitro Translation) wandern in SDS-PAGE als 130kDa bzw. 100kDa Proteine (Hummel et al., 1983).

Der sehr große Glycosylierungsanteil kann die Funktion einer hydrophilen Oberfläche übernehmen und somit sind hydrophile Bereiche in der Proteinkette nicht sehr ausgeprägt. Die vorhergesagten Bereiche um Aminosäure 50 und am C-terminalen Ende konnten jedoch als Immunogene identifiziert werden.

Der von dem 1.9kb-PstI-Fragment kodierte Proteinteil schließt das C-terminale Fragment mit ein und enthält zusätzlich noch den Teil, der vor der Synthese von gp250 ausgeschnitten wird. Mit diesem Set von gp250/350-Fragmenten läßt sich unterscheiden, ob in einem Serum Antikörper nur gegen Epitope aus dem 'splice'-Fragment vorhanden sind. Dies ist eventuell von Bedeutung bei der Diagnose von chronischen EBV-Infektionen (Jilg und Wolf, 1985). Es ergaben sich Hinweise, daß bei diesen Personen nur das gp350, nicht jedoch gp250 erkannt wird. Das würde bedeuten, daß sie nur Antikörper gegen das 'splice'-Fragment besitzen.

Mit den bakteriell exprimierten Produkten sollte die Bestimmung von Antikörpern gegen das 'splice'-Fragment nun wesentlich einfacher sein: die beiden antigenen Fragmente vom N-Terminus (aus pUCLEP600) und vom C-Terminus (pUCLXP390) müßten dabei keine Reaktion zeigen, dagegen sollte das große PstI-Fragment kodierte Protein reagieren.

Bei der Expression ergaben sich zum Teil dieselben Probleme wie bei p138, das 1.9kb-PstI-Segment wird nicht in sehr hohem Ausmaß produziert, die kleinen Fragmente sind nicht mehr besonders stabil als Nicht-Fusionsproteine oder verlieren ihre Antigenität (pUCLXP390); Fusionsproteine mit dem stabilen p138-Segment brachten nicht die erhoffte Expressionsteigerung.

Aus diesem Grund wird zur Zeit die Reinigung des N-terminalen Fragments (pUCLEP600) sowie die des großen PstI-Bereiches (pUC19LP1.9) für die Verwen-

dung im ELISA versucht. Die Expressionsmenge von pUCLEP600 wurde auf ca 2%-3% des Totalproteins geschätzt, die von pUC19LP1.9 auf unter 1%.

Für die Immunisierung eines Kaninchens wurde das β -Galaktosidase Fusionsprotein mit dem 1.9kb-Pst-Fragment gereinigt.

Beisel et al. (1985) erhielten mit dem Expressionsprodukt des etwas verkleinerten PstI-Fragments nach Immunisierung von Kaninchen ein Serum, das die Transformation von B-Lymphozyten durch das Virus verhindern kann. Antikörper aus der Immunisierung mit dem pURLP1.9-kodierten Proteins scheinen dieselbe Eigenschaft zu besitzen, denn eine Expression von EBNA-1 in BJA-B Zellen ist nur bei dem zuvor nicht mit dem Serum inkubierten Virus nachzuweisen.

Die Verwendung der bakteriell exprimierten gp-Fragmente als Vakzine wäre somit theoretisch möglich. Dagegen spricht jedoch die bis jetzt nicht sehr effektive Expression dieses großen Fragments als Nicht-Fusionsprotein und die schwierige, 100%ige Aufreinigung.

Neutralisationsversuche mit Serum gegen die kleineren Fragmente wurden bisher noch nicht durchgeführt. Sie sind auch noch nicht sinnvoll, da das C-terminale Fragment (pUCLXP390) als Nicht-Fusionsprotein für NPC-Serum seine Antigenität verloren hat und es deshalb fraglich ist, ob Antikörper dagegen in der Lage sind, das native Protein zu erkennen.

Da die Fusion mit dem N-terminalen Fragment (LEP600) in der Reihenfolge C-terminal:N-terminal kein stabiles Produkt liefert, wird noch ein Konstrukt mit umgekehrter Reihenfolge versucht, bei dem eventuell Stabilität und Antigenität erhalten bleiben.

p150

Die Expression von p150 (VCA) wurde nach demselben Schema wie bei p138 und gp250/350 vorgenommen: Überprüfung der Computervorhersage durch Subklonierung und Expression als Fusionsprotein mit dem pUR-Vektor; anschließend Expression in pUC-Vektoren. Als Ergebnis wurde eine haupt-immunogene Stelle am N-Terminus und zwei gering reaktive (pUR288DTT700 und pUR290DTP680) gefunden; als Nicht-Fusionsprotein ist der N-Terminus nicht besonders stabil, dagegen sind zwei weitere Fragmente aus dem mittleren Bereich stabil exprimierbar. Bei einem Segment, kodiert von pUR288DTT700 bzw. pUC8DTT700, reagiert das Nicht-Fusionsprotein stärker als das korrespondierende pUR-Konstrukt. Offenbar liegt auch sterische Hinderung der Antikörperbindung durch den β -Gal Fusionsteil vor, wie es schon bei dem FR.IV von p138 und dem N-terminalen Bereich von gp250/350 gefunden wurde.

Es ergibt sich hier dieselbe Konstellation wie bei p138: von den beiden

reaktiven Regionen ist eine sehr stabil als Nicht-Fusionsprotein, die zweite und stärker immunogene jedoch nicht besonders. Es bietet sich auch hier an, diese Segmente miteinander zu fusionieren.

EBNA-1

Bei der EBNA-1-Expression konnte auf die Lokalisation von immunogenen Region verzichtet werden, da der N-terminale Bereich dieses Proteins aus sich wiederholenden Aminosäuremustern besteht und hydrophob ist. Der C-terminale Bereich ist als 25kDa-Nicht-Fusionsprotein (174aa) relativ gut exprimierbar, dabei wird der natürliche Translations-Stop benutzt.

Milman et al. (1985) konnten dieses Protein ebenfalls in Bakterien produzieren; sie benutzten allerdings N-terminale 36aa des N-Proteins vom lambda-Phagen als Fusionspartner.

Die Reinigung dieses Expressionsproduktes ist inzwischen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Sephadex-SP-Chromatographie gelungen. Mit dem Protein wurden Mäuse für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern immunisiert, und es wurde als Antigen in ELISA's eingesetzt. Die dabei erzielten Resultate lassen wie schon bei dem p138-Antigen eine erhebliche Verbesserung der Sensitivität und Spezifität erwarten (W. Jilg, persönliche Mitteilung).

p54

Als einziges Protein konnte das p54 vollständig in E.coli exprimiert werden. Am N-Terminus sind noch sieben pUC-kodierte Aminosäuren fusioniert und der p54-Translationsstop wird benutzt.

Die Ausbeute an Protein ist zwar nicht besonders hoch, aber die Antigenität dafür sehr gut. Es bleibt nach Expression löslich in der Zelle, seine Reinigung ist inzwischen auf bis zu 80% Reinheit gelungen.

Als Fazit der E.coli-Expression von EBV-Antigenen wurden also fünf Proteine oder Segmente davon erhalten, die die EA-, VCA- und MA-Antigengruppen abdecken sollten. Drei davon werden in Mengen produziert, die eine Reinigung und Verwendung in ELISA's sinnvoll erscheinen lassen (p138, p54, EBNA1).

EBV-Protein	Klassifizierung	Expressionsplasmid	exprimierte aa/ des EBV-Proteins	fremde aa oder C-terminal	β-Gal (116kDa) N-terminal
p138	'frühes' Protein DNA-Bindung	pUCARG1140	375/1128 (33,2%)	6aa	5aa
EBNA-1	latent exprimiert in infizier. Zellen	pUC8KSH1.2	191/641 (29,7%)	6aa	--
p54	'frühes' Protein	pUC9MBCE3.2	404/404 (100%)	14aa	--
p150	Bestandteil des Virus-Kapsids	PUR290CXH580	185/1381 (13,4%)	β-Gal+14aa	17aa
gp250/350	Membranproteine	pURLP1.9	634/907 (69,9%)	β-Gal+4aa	10aa
gp250/350	Membranproteine	pUC19LP1.9	634/907 (69,9%)	9aa	23aa

Tab.4 Zusammenfassung der exprimierten EBV-Proteine, die für die Bestimmung von IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern in Seren von Patienten mit unterschiedlichem EBV-Status benutzt wurden (Abb.45). Angegeben sind die Klassifizierung der Proteine, die Expressionsplasmide mit der Anzahl der kodierten Aminosäuren des authentischen EBV-Antigens. In den beiden letzten Spalten sind die Zahl fremder, pUC-Vektor-kodierter Aminosäuren am C- und N-Terminus aufgeführt. β-Gal Fusionsproteine aus PUR-Vektoren sind ebenfalls angegeben.

Bei dem VCA-Protein p150 kann vorläufig das β -Gal Fusionsprotein verwendet werden, die Stabilisierung des haupt-immunogenen Fragments durch Fusion mit stabilen Segmenten ist geplant. Das gleiche gilt für gp250/350, zusätzlich wird hier das große PstI-Fragment kodierte Protein als Nicht-Fusionsprotein verwendet. Tab.4 gibt einen Überblick über diese EBV-Antigene, die Expressionsplasmide, sowie bakterielle Fusionsanteile.

Dieses Set von fünf Antigenen sollte eine Aussage über den Status von EBV und assoziierten Krankheiten zulassen. Bakterienlysate mit den fünf exprimierten Antigenen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit individuellen Seren inkubiert. Dabei wurden Seren von einer EBV-negativen Person, von einem Patienten mit Mononukleose, von einer normal EBV-positiven Person und von einem NPC-Patienten verwendet. Diese vier Seren wurden mit je drei Western Blots inkubiert und dann die gebundenen IgM-, IgG- und IgA-Antikörper durch Immunfärbung nachgewiesen. Das Resultat dieser zwölf Nachweise ist in Abb.45 gezeigt.

Bei dem EBV negativen Serum ist wie zu erwarten, keine spezifische Reaktion zu finden.

Nach Infektion werden besonders massiv IgM Antikörper gebildet, die hauptsächlich mit dem p54 und dem gp250/350 reagieren. Daneben gibt es auch schon IgG- und IgA-Antikörper gegen p54. Die unspezifischen Reaktionen gegen *E.coli*-Proteine sind hier besonders stark, offensichtlich eine Folge der Stimulation von B-Lymphozyten zu Beginn der Infektion.

Nach abgelaufener Infektion sind IgG Antikörper gegen das virale Membranprotein zu finden. Charakteristisch ist auch das Auftauchen von Antikörpern gegen EBNA-1 als Folge der Expression dieses Proteins von den latent vorliegenden EBV-Genomen in B-Lymphozyten.

Bei dem NPC-Patientenserum sind hohe IgG-Titer gegen alle getesteten EBV-Antigene zu finden. Aufgrund von IF-Testen wurde gefunden, daß IgA-Titer gegen frühe Proteine (EA) besonders typisch sind. Dies wurde auch durch Verwendung von p138 und p54 im ELISA bestätigt und in der Aussagekraft deutlich erhöht.

Mit der Kombination der fünf Antigene und dem Ig-Klassen-spezifischen Nachweis sollte es also möglich sein nach deren Aufreinigung mit ELISAs eine Diagnostik EBV-korrelierter Krankheiten zu betreiben.

Abb.45 Legende nächste Seite

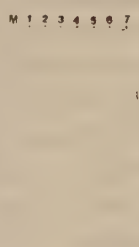
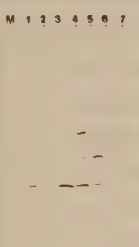
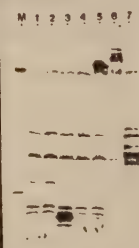
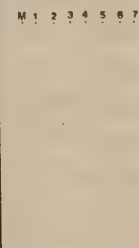
	IgM	IgG	IgA
EBV-negativ			
Infekt. Mono-nukleose			
EBV-positiv			
NPC Nr.359			

Abb.45 Korrelation von EBV-Status oder assoziierter Krankheit mit IgM-, IgG- und IgA-Titern gegen bakteriell exprimierte EBV-Antigene.

Western Blots mit den IPTG induzierten Lysaten nach Auftrennung im 10%-SDS PA Gel wurden mit jeweils vier Seren inkubiert und IgM, IgG und IgA nachgewiesen.

1) pUC8, negative Kontrolle; 2) pUCARG1140 (p138); 3) pUC8KSH1.2 (EBNA-1); 4) pUC9MBcE3.2 (p54); 5) pUR288CXH580 (p150/VCA); 6) pURLP1.9 (gp250/350); 7) pUC19LP1.9 (gp250/350).

Expression in Eukaryontenzellen

Ein Nachteil bei den MSV-Konstrukten für die Expression von EBV-Proteinen in 3T3-Zellen liegt an zu ungenauer Positionierung der Insertionen hinter dem LTR-Promotor. Ursprünglich war gedacht worden, daß die MSV-LTR-Sequenz mit Enhancer-Sequenz stark genug sein würde, ein Transkript bis über die ca. 4kb davon entfernte EBV-Sequenz zu transkribieren oder den EBV-Promotor durch Enhancer-Wirkung anzuschalten. Dies scheint jedoch in keinem Fall (p138, p150 und gp250/350) gelungen zu sein. Offensichtlich sind die EBV-Promotoren auch in den 3T3-Zellen so stark reprimiert, daß der LTR-Enhancer keine Wirkung zeigt.

Die konstitutive Expression von EBNA-1 in B-Lymphozyten wird von einem Promotor, dessen Lage nicht genau bekannt ist, gesteuert. Unmittelbar vor dem ORF (BKRF1) befindet sich eine 'splice' Akzeptorstelle, durch die das Exon des EBNA-1-kodierenden Bereiches prozessiert wird (Speck und Strominger, 1985). Die MSV-LTR-Sequenz besitzt nach dem Transkriptionsstart eine 'splice'-Donorstelle, die für die Prozessierung des onc-Transkripts benutzt wird. Offenbar entsteht zusammen mit dieser Sequenz und der 'splice'-Akzeptorstelle vor BKRF1 ein translatierbares Transkript für EBNA-1. Dies wurde jedoch nicht genauer überprüft.

Das Expressionssystem mit den DHFR-negativen CHO-Zellen hat den Vorteil gegenüber dem 3T3-Retrovirussystem, daß die Selektion nicht durch ein aktives onc-Gen erfolgt, was bei einer möglichen Verwendung des Glycoproteins als Vakzine zumindest bedenklich wäre. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Amplifizierung von einrekombinierten Sequenzen durch Selektion mit Methotrexat (MTX) (Kaufmann und Sharp, 1982b). Dabei werden die Zellen gezwungen, die Kopienzahl des transfizierten dhfr-Gens und damit die Menge an Enzym zu erhöhen, um der Inaktivierung der Dihydrofolat-Reduktase durch MTX zu ent-

gehen. Co-transfizierte Sequenzen werden auf diese Weise ebenfalls amplifiziert und damit läßt sich eine erhebliche Verbesserung der Expression erzielen (Kaufman und Sharp, 1982,b)

Für eukaryotische Expressionsvektoren können dhfr-Sequenzen prokaryotischen und eukaryotischen Ursprungs verwendet werden. O'Hare et al. (1981) identifizierten und klonierten eine prokaryotisches dhfr-Gen von einem R-Faktor. Dieses Enzym ist gegen geringe Konzentrationen von MTX resistent. Das bei pMDIII verwendete Enzym wird von einer Maus-cDNA kodiert (Chang et al., 1976) und ist im Gegensatz zum prokaryotischen Enzym völlig MTX-sensitiv. In diesem Konstrukt sitzt vor der ca. 900bp langen kodierenden Region des dhfr-Gens eine Adenovirus-2-Sequenz, die den 'major late'-Ad2-Promotor und die ersten Nukleotide der späten mRNA mit einer 'splice'-Donorstelle kodiert. Für die korrekte Prozessierung des Transkripts ist schließlich noch zwischen den Ad2-Promotor und die dhfr-Sequenz ein 90bp-langes Segment inseriert, das eine 3'-'splice'-Akzeptorstelle der variablen Region eines Immunglobulin Gens enthält (Bothwell et al., 1981). Der Ad2 'late' Promotor wird spät in der Infektion angeschaltet, so daß er bei den Bedingungen in den CHO-Zellen aufgrund fehlender Stimulierung durch 'frühe' Adenoproteine oder aufgrund Suppression von zellulären Bestandteilen wenig Transkripte initiiert. Bei diesem ursprünglichen Konstrukt von Kaufman und Sharp (1982,a) konnte auch nur eine sehr geringe Transformationsrate von dhfr⁻-Zellen erzielt werden. Aus diesem Grund ist 5' vor den Ad2-Promotor eine SV40-Sequenz mit dem 72bp-Enhancer integriert worden, der eine höhere Initiation der DHFR-mRNA vom Ad2-Promotor und damit auch eine bessere Transfektionsausbeute bewirkt. Es ist denkbar, daß an einer von mehreren möglichen Rekombinationsstellen nur die dhfr-Sequenz integriert wird. Bei der Selektion mit MTX für die Amplifizierung könnte dann diese Stelle leichter amplifiziert werden, wenn an anderen Integrationsstellen eine co-Amplifikation des viralen Gens eine Behinderung der Zellen darstellt. Aus diesem Grund wurde die gp250/350 kodierende Sequenz mit dem Selektionsmarker auf einem Konstrukt zusammengefügt, so daß Co-Transfektion mit zwei verschiedenen Plasmiden vermieden werden kann. Diese Integration kann entweder stabil bleiben (Schimke et al., 1981), es kann auch wieder zu einem Verschwinden der transfizierten Sequenzen bei der Absetzung des Selektionsmediums kommen. In diesem Fall sitzen die Sequenzen nicht im Chromosom, sondern in kleinen 'double minute chromosomes', die bei der Mitose nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, sondern ausverdünn werden (Kaufman et al., 1979).

Für eine Kombination der verschiedenen Teile war es nötig, das dhfr-Gen mit seinen transkriptionalen Regulationssequenzen so umzuklonieren, daß dieser Bereich mit einem einfachen Enzymverdau als Kassette isoliert und umgesetzt werden kann. Dies geschah durch Konstruktion des Plasmids pUCSVDH und Verd mit Sall.

Als Transkriptionsinitiation für die Expression von gp250/350 wurde der SV40 'early' Promotor mit den Enhancersequenzen benutzt. Das 418bp-Fragment enthält die Nukleotidsequenz von einer HindIII-Stelle (Position 5171) bis zur HpaII-Stelle (Pos. 346), mit den Enhancer-Sequenzen (72bp Repeat) sowie die 16bp-invertierte Region, von der aus die Transkription der frühen mRNA startet. Die HindIII-Stelle, 40bp davon entfernt, befindet sich noch in dem 5'-nicht-translatierten Bereich, 7bp vor dem Start-Codon für die t-Antigene (O'Hare et al., 1981).

Nach Umwandlung der HindIII- in eine BamHI-Stelle durch Einsetzen eines Linkers wurde ein 760bp-BamHI/EcoRI Fragment aus dem Kaninchen β -Globin G eingesetzt (van den Berg et al., 1978). Diese Sequenz startet mit dem Aminosäuren Codon 99, nach 18 Nukleotiden kommt eine 'splice'-Donorstelle sowie nach ca. 700bp eine 'splice'-Akzeptorstelle, die für eine Prozessierung des Transkripts sorgen.

Von der 'splice'-Akzeptorstelle bis zur EcoRI-Stelle sind es dann nochmals 54bp. Die prozessierte Form des Transkripts aus dieser Region enthält demnach 72 Nukleotide, die für β -Globin kodieren, aber nicht translatiert werden, da 5' davon bis zum Start der mRNA vom SV40-'early'-Promotor kein AUG vorkommt. Die 'splice' Signale sind eingefügt worden, weil prozessierte mRNA stabiler bleibt und besser ins Zytoplasma transportiert wird (Hamer und Leder, 1979). Diese Konstruktion (pKCR, O'Hare et al, 1981) wurde von Breathnach und Harris (1983) weiter verändert, indem sie nach der EcoRI-Stelle der β Globin 'splice' Donor- und Akzeptorsequenz noch eine Poly-Adenylierungsstelle von SV40 einführen. Das daraus resultierende Plasmid, pSVE, wurde für die Konstruktion von pMDIIGP verwendet. Poly-Adenylierungs- und Plasmidsequenzen wurden durch EcoRI/Sall-Verdau wieder eliminiert, die Polylinkersequenz von pUC18 von EcoRI bis Sall eingesetzt und anschließend noch die dhfr-Sequenz und das gp250/350-kodierende Fragment von pUC18GP.

Die schlechte Ausbeute an dhfr⁺-CHO-Klonen bei Transfektion mit pMDIIGP im Vergleich zu pMDIII deutet auf einen toxischen Effekt des Glycoproteins hin. Die Zellen sind während der Selektionsphase, die 10-14 Tage dauert, bedingt durch die Umstellung der Transkription von den transfizierten Sequenzen in einer schlechten Verfassung. Es ist vorstellbar, daß die Integration des EBV-

Glycoproteins in die Membran eine zusätzliche Belastung bedeutet und deshalb bei vielen Zellen zum Absterben führt. Das Unvermögen der gp250/350-positiven Klone, die transfizierten Sequenzen nach MTX Gabe zu amplifizieren unterstützt diesen Verdacht.

Durch Immunfluoreszenztest wurden zwei Klone gefunden, die eine Membranfluoreszenz aufweisen. Bei beiden konnten die zwei EBV-Glycoproteine durch Iodinierung der Oberfläche und Immunpräzipitation mit einem anti-gp250/350 monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Die Intensität der beiden immunpräzipitierten Proteinbanden läßt vermuten, daß gp350 bevorzugt produziert wird. Dies stimmt jedoch nicht, wie die Immunpräzipitation mit dem NPC-Pool-Serum zeigt. Hier sind beide Komponenten gleich stark vertreten. Offenbar erkennt der monoklonale Antikörper einen gp350-Bereich besonders gut, während im Pool-Serum Antikörper gegen sämtliche immunogene Regionen vorhanden sind. Die authentischen Glycoproteine aus B95-8 Zellen haben ein etwas größeres Molekulargewicht, das durch ein verändertes Glycosylierungsmuster bewirkt werden könnte. In der Aminosäurekette sind 37 Asparagin-X-Serin oder Asparagin X-Threonin Sequenzen, die Akzeptorstellen für N-gebundene Glycosylierungen darstellen können (neben möglichen O-glycosidischen mit Serin oder Threonin). Marmoset-Zellen, die mit EBV infiziert sind, produzieren generell die zwei Glycoprotein-Formen mit etwas größeren Molekulargewichten als humane Lymphozyten (Edson und Thorley-Lawson, 1981), was eventuell eine Folge von geringen Variationen der posttranslationalen Veränderungen sein könnte.

Die gp250/350-kodierenden Transkripte der CHO-Zellen sind etwas länger als die der B95-8-Zellen oder P3HR1-Zellen. Bei der Klonierung der Sequenz wurde die Polyadenylierungsstelle mit isoliert, so daß die mRNA der CHO-Zellen gleich terminiert werden sollte. Die Unterschiede werden durch die verschiedenen 5'-nicht-translatierten Regionen verursacht. Beisel et al. (1985) bestimmten als Startpunkt der gp250/350 mRNA ein Adenin 19nt vor dem Startcodon. Bei pMDIIIIP sind andere 5'-Sequenzen vorhanden. Das SV40-Promotor Fragment steuert 40nt bei (O'Hare et al., 1981); durch die β -Globinsequenz in der prozessierten Form werden 72nt zugefügt (van den Berg, 1978) und die pUC18-Sequenz des Linkers von EcoRI bis zum ATG von gp250/350 ist noch 36nt lang. Insgesamt ergibt sich also eine Verlängerung von 129nt. Dieser Unterschied ist durchaus in Abb.43 zu erkennen.

Wie bei den authentischen Transkripten werden auch in den CHO-Zellen die 'splice'-Signale für die Generierung der gp250 kodierenden mRNA erkannt. Dabei spiegelt die Situation auf der Transkriptionsebene die der Proteinebene wieder (Edson und Thorley-Lawson, 1981): in B95-8-Zellen wird das Tran

kript kaum prozessiert, sie produzieren auch hauptsächlich die gp350-Komponente. Dagegen läuft das 'splicing' in P3HR1-Zellen sehr effektiv ab, diese besitzen auch fast ausschließlich gp250. Die CHO-Transkripte schließlich weisen gleiche Mengen der beiden Formen auf.

Für diese Unterschiede gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1) Die drei gp250/350 produzierenden Zellen, B95-8, P3HR1 und CHO/pMDIIGP sind aus unterschiedlichen Spezies; B95-8 sind EBV-immortalisierte B-Lymphozyten aus Marmosets, P3HR1 menschliche B-Lymphozyten und CHO sind Nagerzellen. Es könnte sein, daß die 'splice'-Signale von gp250/350 in diesen Zellen unterschiedlich gut (oder schlecht) erkannt und prozessiert werden. Dies würde voraussetzen, daß die Sequenz dieser Stellen von der Konsensussequenz abweicht, also eine 'schlechte' Erkennung bedingt und damit auch nur partiell gesplacet wird. Minimale Unterschiede in den 'splice'-Präferenzen der drei unterschiedlichen Zelllinien würden dann die unterschiedlichen Mengen an prozessiertem Transkript bedingen. Diese Konsensussequenz bestimmt aus 139 Exon/Intron-Übergängen, lautet nach Mount (1982):

C	A	T
AG/GT	AGT.....	()NCTAG/G
A	G	C

Die gp250/350-Sequenz an diesen Stellen ist (Beisel et al., 1985):

AAA/GTAAG.....AATGTCACCAAAG/G

Bei der Exon-Sequenz an der Donorstelle tritt bei EBV ein Adenin anstatt eines Guanins, wie es bei 73% der von Mount untersuchten Sequenzen auftrat. Bei der Akzeptorstelle fehlt der Pyrimidin-reiche Bereich im Intron, außerdem ist anstelle des Pyrimidins 3nt vor dem Übergang ein Purin, was nur bei 5% der untersuchten Sequenzen gefunden wurde.

Die EBV-Sequenz entspricht also durchaus nicht optimalen 'splice'-Signalen, eine mögliche Folge davon könnte unterschiedlich stark ausgeprägtes, partielles Prozessieren des Transkriptes in den verschiedenen Zelllinien sein.

2) Bei EBV-Zelllinien aus Burkitts-Lymphomen und B-Lymphozyten, die mit Wildtyp-EBV-Isolaten immortalisiert werden, treten beide Glycoproteine in äquimolaren Mengen auf (Edson und Thorley-Lawson, 1981), d.h. die Glycoprotein Menge in den CHO-Zellen entspricht dem Normalzustand. Dies würde bedeuten, daß die B95-8-Zellen und P3HR1-Zellen Veränderungen ihres 'splice'-Mechanismus haben oder an den Signalsequenzen Mutationen aufweisen, die vielleicht während der langen Zeit seit ihrer In-Kulturnahme aufgetreten sind, und für das unterschiedliche Prozessieren verantwortlich sind.

Aufgrund der niedrigen Produktionsrate von gp250/350, sowie des vergeblichen Versuchs die Sequenzen zu amplifizieren, erscheint eine Verwendung dieser CHO-Klone für die Großpräparation an EBV-MA nicht sinnvoll. Eine Möglichkeit, die vermuteten toxischen Auswirkungen der rekombinanten Proteine zu umgehen und die Expressionsausbeute zu erhöhen, wäre die Verwendung eines induzierbaren Promotors, wie etwa eines 'heat shock'- oder Metallothionin-Promotors. Der Nachteil bei diesem System ist dann allerdings immer noch der begrenzt zur Verfügung stehende Platz auf der Oberfläche der Zellen.

Membran- und sekretorische Proteine werden am zytoplasmatischen Retikulum synthetisiert und mit ihrer hydrophoben N-terminalen 'leader'-Sequenz durch die Membran transferiert. Im Falle von gp250/350, bei denen der N-Terminus außerhalb der Zytoplasma-Membran ist, stoppt der Vorgang mit Erreichen der C-terminalen Transmembran-Region, die in der Membran steckenbleibt, da der darauf folgende hydrophile Bereich nicht mehr durch die Membran geschleust werden kann.

Durch Entfernung dieser Transmembran-Region und Einfügen eines definierten Stop-Codons unterbleibt die Verankerung und die Proteine werden sekretorisch. Ein entscheidender Vorteil der Sekretion ist die vereinfachte Reinigung. Die Membran-verankerten Proteine mußten mit Detergenz solubilisiert werden, wobei natürlich noch ein große Menge an anderen Zellproteinen dabei war. Durch die Eliminierung der Ankersequenz kann die Reinigung aus dem Medium erfolgen, wo nur Proteine des fötalen Kälberserums, in der Hauptsache Albumin, kontaminierend sind.

Da die Zellen auch noch bei unter 5% FKS wachsen, kann die Menge der Serumproteine noch verringert werden. Bei Versuchen, den Zellkulturüberstand bzw. die Proteine, mit Hilfe von Ammoniumsulfatfällungen zu konzentrieren, zeigt sich, daß die EBV-Glycoproteine erst ab Konzentrationen von über 50% gefällt werden. Da ein Großteil der Serumproteine schon bei niedrigeren Konzentrationen gefällt wird, sollte durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällungen eine Anreicherung von gp250/350 erreicht werden.

Die Menge an Expressionsprodukten kann nun auch durch Amplifikation entscheidend gesteigert werden, da der vermutete toxische Effekt auf Zell-Membranen wegfällt. Michel et al. (1984) beschreiben eine Amplifikation des Gens für Hepatitis B Virus-Oberflächenprotein (sAg) auf 1000 Kopien pro CHO-Zelle. Falls dies bei den gp250/350-kodierenden CHO-Zellen auch gelingt, sollte genügend Protein für eine effektive und ökonomische Reinigung produziert werden.

Damit stünden diese Proteine eventuell als Vakzine gegen EBV zur Verfügung.

Die EBV-neutralisierende Wirkung von Antikörpern gegen gp250/350 und Schutzversuche mit aus B95-8 gereinigten gp350 in Cottontop-Tamarins bestätigen dies (Epstein et al., 1985).

Mackett und Arrand (1985) beschreiben ein rekombinantes Vaccinia-Virus, das das Gen für gp350 enthält und nach Infektion von Zellen eine Expression des Membranproteins bewirkt. Sie konnten ebenfalls zeigen, daß eine Impfung von Kaninchen mit dem Virus die Bildung von Antikörpern gegen gp350 bewirkt. Die Impfung mit diesem Virus wäre um ein Vielfaches billiger und einfacher als mit den aus Zellkultur gewonnenen Proteinen. Es bleibt aber abzuwarten, ob dieses Vaccinia-Virus auch in der Lage ist, beim Menschen eine Immunisierung zu bewirken und ob die Sicherheit dieses Lebendimpfstoffes gewährleistet ist. Das rekombinante Virus könnte das EBV-Protein auf seiner Oberfläche besitzen, das eine Erkennung und Infektion von B-Lymphozyten möglich machen könnte.

Wegen dieser angesprochenen Risiken einer Impfung mit einem EBV-rekombinanten Lebendimpfstoff wird sich herausstellen, ob nicht die in Zell-Kultur produzierten Glycoproteine die bessere Alternative darstellen.

Eine Impfung in westlichen Ländern, insbesondere mit den rekombinanten Vacciniastämmen, hat wohl wenig Aussicht, realisiert zu werden, da hier das Virus kaum ernsthafte Erkrankungen hervorruft. Dagegen wäre sie in Ländern Zentralafrikas mit einer hohen Burkitt's Lymphom-Inzidenz und in den NPC-Hochrisiko-Gebieten in China interessant (Epstein; 1976).

Da die Durchseuchung mit EBV in den Risiko-Gebieten schon bei Kleinkindern sehr hoch ist, müßte eine Impfung bald nach der Geburt stattfinden. NPC entsteht nach oft jahrzehnterlanger Latenzzeit von EBV; der Erfolg einer Impfung gegen diesen Tumor wäre also erst in der nächsten Generation absehbar. Für die jetzige Situation ist deswegen die Verbesserung der Diagnostik und Früherkennung von NPC und Burkitt's Lymphom von entscheidender Bedeutung. Die in Bakterien produzierten Antigene sollten dabei hilfreich sein.

Literatur

Amann, E. and Brosius, J.: 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40 (1985) 183-190.

Amann, E., Brosius, J. and Ptashne M.: Vectors bearing a hybrid trp-lac promotor useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25 (1983) 167-190.

Andersson-Anvert, A., Forsby, N., Klein, G. and Henle, W.: Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridisation and histopathological examination. *Int. J. Cancer* 20 (1977) 486-491.

Argos, P., Hanei, M. and Garavito, M.: The Chou-Fasman secondary structure prediction method with an extended data base. *FEBS Letters* 93 (1978) 19-24.

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.C., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tuffnell, P.S. and Barrell, B.G.: DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310 (1984) 207-211.

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: Epstein-Barr virus-induced cell fusion. *Nature* 287 (1980) 164-167.

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: The regulated expression of Epstein-Barr virus. III. Proteins specified by EBV during the lytic cycle. *J. Gen. Virology* 56 (1981) 105-118.

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: Effect of the arginine analog Canavanine

on the synthesis of Epstein-Barr virus-induced proteins in superinfected Raji cells. *J. Virol.* 41 (1982) 1109-1111.

Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F. and Kieff, E.: Two major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J. Virol.* 54 (1985) 665-674.

Bornkamm, G.W., Hudewentz, J., Freese, U.K. and Zimmer, U.: Deletion of the non-transforming Epstein-Barr virus strain P3HR1 causes fusion of the large internal repeat to the DS_L region. *J. Virol.* 43 (1982) 952-968.

Bothwell, A.L.M., Paskind, M., Reth, M., Imanishi-Kari, T., Rajewsky, K. and Baltimore, D.: Heavy chain variable region contribution to the NP^b family of antibodies: somatic mutation evident in a 2a variable region. *Cell* 24 (1981) 625-637.

Breathnach, R. and Harris, B.A.: Plasmids for the cloning and expression of full-length double-stranded cDNAs under the control of the SV40 early or late gene promoter. *Nucl. Acids Res.* 11 (1983) 7119-7136.

Buell, G.N., Reisman, D., Kitner, C., Crouse, D. and Sudgen, B.: Cloning overlapping DNA fragments from the B95-8 strain of Epstein-Barr virus reveals a site of homology to the internal repetition. *J. Virol.* 40 (1981) 977-982.

Burkitt, D.: A sarcoma involving the jaws in African children. *Br. J. Surg.* 46 (1958) 218-223.

Burkitt, D.: Determining the climatic limitation of a children's cancer common in Africa. *Br. Med. J.* 2 (1962) 1019-1023.

Burnette, W.N.: 'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analyt. Biochem.* 112 (1981) 195-203.

Chang, A.C.Y., Nunberg, J.H., Kaufman, R.J., Erlich, H.A., Schimke, R.T. and Cohen, S.N.: Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase. *Nature (London)* 275 (1978) 617-624.

Chasin, L.A. and Urlaub, G.: Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dehydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 (1979) 5294-5299.

Chou, P.J. and Fasman, G.D.: Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet and random coil regions. *Biochemistry* 13 (1974a) 211-222.

Chou, P.J. and Fasman, G.D.: Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13 (1974b) 222-245.

Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L. and Eisenberg, R.J.: Localisation and synthesis of an antigenic determinant of Herpes Simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 49 (1984) 102-108.

Cohen, L.K., Speck, S.H., Roberts, B.E. and Strominger, J.L.: Identification and mapping of polypeptides encoded by the P3HR1 strain of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 4183-4187.

de Schryver, A., Friberg, S.J., Klein, G., Henle, W., Henle, G., de The, D., Clifford, P. and Ho, H.C.: Epstein-Barr virus-associated antibody patterns in carcinoma of the postnasal space. *Clin. Exp. Immun.* 5 (1969) 443-459.

Desgranges, C., Wolf, H., de The, G., Shanmugaratnam, K., Cammoun, N., Ellouz, R., Klein, G., Lennert, K., Munoz, N. and zur Hausen, H.: Nasopharyngeal carcinoma: X. Presence of Epstein-Barr genomes in separated epithelial cells of tumors in patients Singapore, Tunisia and Kenya. *Int. J. Cancer* 16 (1975) 7-15.

Denhardt, D.T.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 (1966) 641-646.

Devereux, K., Haeberli, P. and Smithies, O.: A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 378-395.

Edson, C.M. and Thorley-Lawson, D.A.: Epstein-Barr virus membrane antigens: Characterization, Distribution and strain differences. *J. Virology* 39 (1981) 172-184.

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S. and Bogner, J.: Induction of Hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55 (1985) 836-839.

Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1 (1964) 702-703.

Epstein, M.A.: Epstein-Barr virus - is it time to develop a vaccine program? *J. Natl. Cancer Inst.* 56 (1976) 697-700.

Epstein, M.A. and Achong, B.G. (eds.) *The Epstein-Barr Virus*. Berlin (1979).

Epstein, M.A., Morgan, A.J., Finerty, S., Randle, B.J. and Kirkwood, J.K.: Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine. *Nature* 318 (1985) 287-289.

Fennewald, S., van Santen, V. and Kieff, E.: Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J. Virology* 51 (1984) 411-419.

Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G. and Ysebaert, M.: Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273 (1978) 113-120.

Garnier, J., Osguthorpe, D.J. and Robson, B.: Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120 (1978) 97-120.

Graham, F.L. and van der Eb, A.J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (1973) 456-467.

Hamer, D.H. and Leder, P.: Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* 18 (1979) 1299-1302.

Hanahan, S.D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557-580.

Hayward, G.S., Ambinder, R., Ciufo, D., Hayward, S.D. and LaFemina, R.L.: Structural organization of human Herpesvirus DNA molecules. *J. Invest. Derma.* 83 (1984) 29s-41s.

Heller, M., van Santen, V. and Kieff, E.: Simple repeat sequence in Epstein-Barr virus DNA is transcribed in latent and productive infections. *J. Virol.* 44 (1982) 311-320.

Henderson, A., Ripley, S., Heller, M. and Kieff, E.: Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1987-1991.

Henle, G., Henle, W. and Diehl, V.: Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59 (1968) 94-101.

Henle, W., Henle, G., Azjac, A., Pearson, G., Waubke, R. and Scriba, M.: Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* 169 (1970) 188-190.

Henle, G. and Henle, W.: Epstein-Barr virus IgA-specific serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* 17 (1976) 1-7.

Henle, W. and Henle, G.: Seroepidemiology of the virus. In: Epstein M.A. and Achong, B.G. (eds.) *The Epstein-Barr virus*. Springer Verlag, New York (1979) 62-78.

Hennessy, K., Heller, M., van Santen, V. and Kieff, E.: Simple repeat array in Epstein-Barr virus DNA encodes part of the Epstein-Barr nuclear antigen. *Science* 220 (1983a) 1396-1398.

Hennessy, K. and Kieff, E.: One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983b) 5665-5669.

Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T. and Kieff, E.: A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7207-7211.

Hoffmann, G.J., Layaowitz, S.G. and Hayward, S.D.: Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2979-2983.

Hopp, T.P. and Woods, K.R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3824-3828.

Hummel, M. and Kieff, E.: Mapping of polypeptides encoded by the Epstein-Barr virus genome in productive infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5698-5702.

Hummel, M., Thorley-Lawson, D. and Kieff, E.: An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). J. Virology 49 (1984) 413-417.

Ito, Y., Kawanishi, M., Hirayama, T. and Takabayashi, S.: Combined effect of the extracts from *Croton tiglium* or *Euphorbia lathyris* and n-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR1 and Raji cells. Cancer Letters 12 (1981) 175-180.

Jilg, W. and Wolf, H.: Diagnostic significance of antibodies to the Epstein-Barr virus-specific membrane antigen gp250. J. Infect. Dis. 152 (1985) 222-225.

Kallin, B. and Klein, G.: Epstein-Barr virus carried by Raji cells: a mutant in early functions? Intervirology 19 (1983) 47-51.

Karplus, P.A. and Schulz, G.E.: Prediction of chain flexibility in proteins. A tool for the selection of peptide antigens. Naturwissenschaften 72 (1985) 212-213.

Kaufman, R.J., Brown, P.C. and Schimke, R.T.: Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double-minute chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 5669-5673.

Kaufman, R.J. and Sharp, P.A.: Construction of a modular dihydrofolate reductase cDNA gene: analysis of signals utilized for efficient expression. Mol. Cell. Biol. 2 (1982a) 1304-1319.

Kaufman, R.J. and Sharp, P.A.: Amplification and Expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. J. Mol. Biol. 159 (1982b) 601-621.

Kishishita, M., Ito, Y., Luca, J. and Pearson, G. R.: Localization of Epstein-Barr virus early antigen (EA) by electron Microscopy. In Levine, P.H., Ablashi, D.V. Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. Epstein-Barr virus and associated diseases. Martinus Nijhoff Publishing, 1985, 477-484.

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.

Leder, P., Battery, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T. and Taleb, R.: Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222 (1983) 765-771.

Mackett, M. and Arrand, J.R.: Recombinant vaccinia virus induces neutralising antibodies in rabbits against Epstein-Barr virus membrane antigen gp340. *EMBO J.* 4 (1985) 3229-3234.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).

Masui, Y., Mizuno, T. and Inouye, M.: Novel high-level expression cloning vehicles: 10^4 -fold amplification of *Escherichia coli* minor protein. *Bio/Technology* 2 (1984) 81-84.

Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O'Shiro, E. and Kieff, E.: Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human leukocyte DNA. *Science* 226 (1984) 1322-1325.

Michel, M.-L., Pontisso, P., Sobczak, E., Malpiece, Y., Streek, R.E. and Tiollais, P.: Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7708-7712.

Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. and Lipman, M.: Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Miller, G., Rabson, M. and Heston, L.: Epstein-Barr virus with heterogeneous DNA disrupts latency. *J. Virol.* 50 (1984) 174-182.

Milman, D., Ades, D.K., Cho, M.-S., Hartman, S.C., Hayward, G.S., Scott, A.L. and Hayward, S.D.: Bacterially synthesized EBNA as a reagent for enzyme linked immunosorbant assays. In Levine, P.H., Ablashi, D.V. Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. Epstein-Barr virus and associated diseases. Martinus Nijhoff Publishing (1985), p.426-435.

Modrow, S. and Wolf, H.: Characterization of two related Epstein-Barr virus encoded proteins by synthetic oligopeptides, which are differentially expressed in Burkitt's lymphoma and in vitro transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) eingereicht.

Morgan, A.J. Smith, A.R. Barker, R.N. and Epstein, M.A.: A structural investigation of the Epstein-Barr (EB) virus membrane antigen glycoprotein, gp340. *J.Gen.Virol.* 65 (1984) 397-404.

Mount, S.M.: A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acids Res.* 10 (1982) 459-472.

Niederman, J.C., Evans, A.S., Subrahmanyam, L. and McCollum, R.W.: Prevalence, incidence and persistence of EB virus in young adults. *New Eng.J Med.* 282 (1970) 361-365.

North, J.R., Morgan, A.J., Thompson, J.L. and Epstein, M.A.: Purified EB virus gp340 induces potent virus-neutralizing antibodies when incorporated in liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982a) 7504-7508.

O'Hare, K., Benoist, C. and Breathnach, R.: Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1527-1531.

Pearson, R.E., Bejcek, B. and Conley, A.J.: A physical domain of Herpes Simplex virus ICP8 is expressed and active in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 53 (1985) 360-365.

Pearson, G.R.: Advances in the identification of EBV-specific proteins: an overview. In Levine, P.H., Ablashi, D.V. Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. Epstein-Barr virus and associated diseases. Martinus Nijhoff Publishing, 1985, pp. 411-425.

Penn, I. and Starzl, T.E.: Malignant tumor arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients. *Transplantation* 14 (1972) 407-417.

Pi, G.H., Zeng, Y. and Wolf, H.: Detection of IgA antibody to EBV membrane antigen using *Staph. aureus* preadsorbed sera is closely associated with Nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* (1986) in Druck.

Pope, J.H., Horne, M.K. and Scott, W.: Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer* 3 (1968) 857-866.

Pulvertaft, R.J.V.: Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet* 1 (1964) 238-240.

Pulvertaft, R.J.V.: A study of malignant tumors in Nigeria in short term tissue culture. *J. Clinical Pathology* 18 (1965) 261-273.

Qualtiere, L.F. and Pearson, G.R.: Epstein-Barr virus-induced membrane antigens: immunochemical characterization of Triton X100 solubilized viral membrane antigens from EBV-superinfected Raji cells. *Int. J. Cancer* 23 (1979) 808-817.

Qualtiere, L.F. and Pearson, G.R.: Radioimmune precipitation study comparing the Epstein-Barr virus membrane antigens expressed on P3HR1 virus-superinfected Raji cells to those expressed on cells

in a B95-8 virus-transformed producer culture activated with tumor-promoting agent (TPA). *Virology* 102 (1980) 360-369.

Quinn, J.P. and McGeoch, D.J.: DNA sequence of the region in the genome of herpes simplex virus type 1 containing the genes for DNA polymerase and the major DNA binding protein. *Nucl. Acids Res.* 13 (1985) 8143-8163.

Raab-Traub, N., Pritchett, R. and Kieff, E.: DNA of Epstein-Barr virus. III. Identification of restriction enzyme fragments that contain DNA sequences which differ among strains of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 27 (1978) 288-298.

Raab-Traub, N., Dambaugh, T. and Kieff, E.: DNA of Epstein-Barr virus. VIII. B95-8, the previous prototype, is an unusual deletion derivative. *Cell* 22 (1980) 257-267.

Reddy, V.B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K.N., Zain, B.S., Pan, J., Ghosh, P.K., Celma, M.L. and Weissman, S.M.: The genome of Simian virus 40. *Science* 200 (1978) 494-502.

Reedman, B.N. and Klein, G.: Cellular localisation of an Epstein-Barr virus (EBV) -associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11 (1973) 499-520.

Rickinson, A.: Epstein-Barr virus in epithelium. *Nature* 310 (1984) 99-100.

Rickwood, D. and Hames, B.D. (eds.) *Gel electrophoresis of nucleic acids.* Oxford (1982).

Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., de Thè, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. and Wolf, K.: *Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy.* *Intervirology* 16 (1981) 2201-217.

Roubal, J., Kallin, B., Luca, J. and Klein, G.: Early DNA binding polypeptides of Epstein-Barr virus. *Virology* 113 (1981) 285-292.

Rüther, U. and Müller-Hill, B.: Easy identification of cDNA clones. *EMBO* 2 (1983) 1791-1794.

Sanger, F., Nickeln, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467.

Sassenfeld, H.M. and Brewer, S.J.: A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. *Bio/Technology* 2 (1984) 76-81.

Seibl, R. and Wolf, H.: Mapping of virus proteins on the genome by translation of hybrid-selected RNA from induced P3HR1 cells and induced Raji cells. *Virology* 141 (1985) 1-13.

Schimke, R.T., Brown, P.C., Kaufman, R.J., McGrogan, M. and Slate, D.L.: Chromosomal and extrachromosomal localisation of amplified dihydrofolate reductase genes in cultured mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XLV (1981) 785-797.

Skare, J. and Strominger, J.L.: Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3860-3864.

Smith, J.C., Derbyshire, R.B., Cook, E., Dunthorne, L., Viney, J., Brewer, S.J., Sassenfeld, H.M. and Bell, L.D.: Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene* 32 (1984) 321-327.

Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biology* 98 (1975) 503-517.

Spear, P. and Roizman, B.: Herpes Simplex viruses. In: Tooze, J.

(ed.) Molecular biology of tumor viruses, 2d edition, part 2: DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1980) 615-746.

Speck, S.H. and Strominger, J.L.: Analysis of the transcript encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen I: A potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 8305-8309.

Stanley, K.K.: Solubilisation and immune-detection of β -galactosidase hybrid proteins carrying foreign antigenic determinants. Nucl. Acids Res. 11 (1983) 4077-4092.

Strnad, B.C., Schuster, T.C., Hopkins, R.F., Neubauer, R.H. and Rabin, H.: Identification of an Epstein-Barr virus nuclear antigen by fluoroimmuno-electrophoresis and radioimmuno-electrophoresis. J. Virol. 38 (1981) 996-1004.

Stratowa, C., Doehmer, J., Wang, J. and Hofschneider, P.H.: Recombinant retroviral DNA yielding high expression of Hepatitis B surface antigen. EMBO 3, 1 (1982) 1573-1578.

Sugawara, K., Kawanishi, M. and Ito, Y.: Epstein-Barr virus-related DNA-binding proteins induced by n-butyrate in P3HHR1 cells. Virology 116 (1982) 354-358.

Svedmyr, E. and Jondal, M.: Cytotoxic effector cells specific for B-cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 1622-1626.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P.: Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine-plasmacytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 7837-7841.

Thomas, P.S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments

transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5201-5205.

Thorley-Lawson, D.A. and Edson, C.M.: The polypeptides of the Epstein-Barr virus membrane antigen complex. J. Virol. 32 (1979) 458-467.

Thorley-Lawson, D.A. and Geilinger, K.: Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5307-5311.

van den Berg, J., van Ooyen, A., Mantei, N., Schamböck, A., Großveld, G., Flavell, R.A. and Weissmann, C.: Comparison of cloned rabbit and mouse β -globin genes showing strong evolutionary divergence of two homologous pairs of introns. Nature 276 (1978) 37-44.

Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19 (1982) 259-268.

Weis, J.H., Enquist, L.W., Salstrom, J.S. and Watson, J.R.: An immunologically active chimaeric protein containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. Nature 302 (1983) 1194-1198.

Wolf, H., zur Hausen, H. and Becker, V.: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. Nature New Biology 244 (1973) 245-247.

Wolf, H., Haus, M. and Wilmes, E.: Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. J. Virology 51 (1984) 795-798.

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Jilg, W., Bayliss, G.J., Barrell, B., Golup, E., Zeng, Y. and Gu, S.-Y.: Strategies for the economic preparation of Epstein-Barr virus proteins of diagnostic and protective value by genetic engineering: A new

approach based on segments of virus encoded gene products. In: Williams, A.O., O'Conner, G., de Thè, G. and Johnson, C.A. (eds.) Virus-associated cancers in Africa. IARC Scientific Publications. Lyon, France (1984) pp.525-539.

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Bayliss, G., Modrow, S. and Fan, J.: Selection and production by gentechnological methods of medically relevant EBV-antigens. In Levine, P.H., Ablashi, D.V., Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. (eds) Epstein-Barr virus and associated diseases. Martinus Nijhoff Publishing (1985), s.485-494.

Wolf, H., Motz, M., Modrow, S., Jilg, W., Seibl, R., Kühbeck, R., Fan, J. and Zeng, Y.: Epstein-Barr virus and Nasopharyngeal carcinoma. In: K. Munk (ed), Contr. Oncol., 24, Karger, Basel, 1986, im Druck.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33 (1985) 103-119.

Yates, J., Warren, N. and Sugden, B.: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature 313 (1985) 812-815.

Zeng, Y., Liu, Y.X., Liu, C.R., Chen, S.W., Wei, J.N., Zhu, J.S. and Zai, H.J.: Application of immunoenzymatic method and immunoautoradiographic method for the mass survey of nasopharyngeal carcinoma. Intervirology 13 (1980) 162-168.

Zeng, Y., Zhang, L.G., Li, H.J., Jan, M.G., Zhang, Q., Wu, Y.C., Wang, J.S. and Su, G.R.: Serological mass survey for the early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma in Wuzhou City, China. Int. J. Cancer 29 (1982) 139-141.

Zeng, Y., Zhong, J.M., Mo, Y.K. and Miao, X.C.: Epstein-Barr virus early antigen induction in Raji cells by Chinese medicinal herbs. Intervirology 19 (1983) 201-204.

Zeng, Y., Zhang, L., Wu, Y., Huang, Y., Huang, N., Li, J., Wang, Y., Jiang, M., Fang, Z. and Meng, N.: Prospective studies on NPC in Epstein-Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Wuzhou City, China. *Int. J. Cancer* 36 (1985a) 545-547.

Zeng, Y.: Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China. *Advan. Cancer Res.* 44 (1985b) 121-136.

Zeng, Y. and de The, G.: Nasopharyngeal carcinoma; Early detection and IgA-related per-NPC condition, achievements and perspectives. In Levine, P.H., Ablashi, D.V. Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. Epstein-Barr virus and associated diseases. Martinus Nijhoff Publishing, 1985, s. 151-164

Zhu, X.X., Zeng, Y. and Wolf, H.: Detection of IgG and IgA antibodies to Epstein-Barr virus membrane antigen in the sera from patients with nasopharyngeal carcinoma and normal individuals. *Int. J. Cancer* (1986) im Druck.

Ziegler, J.L., Miner, R., Rosenbaum, E., Lennette, E.T., Shilitoe, E., Casavant, C., Drew, W.L., Mintz, L., Gershow, J., Greenspan, J., Beckstead, J. and Yamamoto, K.: Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet* (1982) 631-633.

zur Hausen, H. and Bauer, G.: Tumor promoters and a naturally occurring serum factor in the induction of Epstein-Barr virus: a review. In: Prasad et al (eds.), Nasopharyngeal carcinoma: current concepts. Kuala Lumpur (1983) 315-320.

Eigene Veröffentlichungen

Seibl, R., Motz, M. and Wolf, H.: Mapping of Epstein-Barr virus by translation of hybrid-selected RNA from P3HR1 and chemically induced Raji cells. ZBL.BAKT. 1984, A257, 162.

Motz, M., Seibl, R., Golub, E., Barrell, B. and Wolf, H.: Expression of the EBV early 138kD protein in E.coli. Abstracts of papers presented at the Ninth International Herpesvirus Workshop, Seattle, 1984, 286.

Wolf, H., Haus, M., Leser, U., Motz, M., Modrow, S., Falser, N., Bandlow, I. and Gu, S.-Y: New developments in nucleic acid hybridisation. Abstracts of papers presented at the Ninth International Herpesvirus Workshop, Seattle, 1984, 64.

Motz, M., Seibl, R., Golub, E., Barrell, B. and Wolf, H.: Expression of the EBV early 138kD protein in E.coli. Abstracts of papers presented at the Sixth International Congress of Virology, Sendai, 1984, 23, P32-36.

Wolf, H., Haus, M., Leser, U., Motz, M., Modrow, S., Falser, N., Bandlow, I. and Gu, S.-Y: New developments in nucleic acid hybridisation. Abstracts of papers presented at the Sixth International Congress of Virology, Sendai, 1984, 23, P32-38.

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Jilg, W., Bayliss, G.J., Barrell, B., Golub, E., Zeng, Y. and Gu., S.-Y.: Strategies for the economic preparation of Epstein-Barr virus proteins of diagnostic and protective value by genetic engineering: A new approach based on segments of virus encoded gene products. In: Williams, A.O., O'Conner, G., de Thè, G. and Johnson, C.A. (eds.) Virus-associated cancers in Africa. IARC Scientific Publications. Lyon, France (1984) pp.525-539.

Wolf, H., Haus, M., Leser, U., Modrow, S., Motz, M., Gu, S.-Y., Falser, N., Bandlow, I., Richter, W., Pathmanathan, R.: New developments in nucleic acids hybridization. In: Williams, A.O., O'Conner, G., de Thè, G. and Johnson, C.A. (eds.) Virus-associated cancers in Africa. IARC Scientific Publications. Lyon, France (1984) pp.373-391.

Bauernfeind, A., Shah, P., Petermüller, C. and Motz, M.: Plasmid-determined resistance to third generation Cephalosporins in Enterobacteria. *Chemioterapia* 4 (1985) 30-31.

Motz, M., Fan, J. and Wolf, H.: Expression des Membranproteins gp250/350 von EBV in E.coli. *ZBL. BAKT. A.* (1985) im Druck.

Motz, M., Fan, J. und Wolf, H.: Expression von antigenen Stellen eines frühen EBV- Proteins in E.coli für die Verwendung in Elisa-Testen. *ZBL. Bakt. A.* (1985) im Druck.

Motz, M., Fan, J. and Wolf, H.: Construction of prokaryotic expression systems for EBV antigens. Abstracts of papers presented at the Tenth International Herpesvirus Workshop, Ann Arbor, 1985, 98.

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Bayliss, G., Modrow, S. and Fan, J.: Selection and production by gentechnological methods of medically relevant EBV-antigens. In Levine, P.H., Ablashi, D.V., Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. (eds) Epstein-Barr virus and associated diseases. Martinus Nijhoff Publishing (1985), s.485-494.

Wolf, H., Haus, M., Leser, U., Modrow, S., Motz, M., Gu, S.-Y., Falser, N., Bandlow, I., Richter, W., Pathmanathan, R.: New developments in nucleic acids hybridization. In: K.-O. Habermehl, Rapid methods and automation in microbiology and immunology, Springer-Verlag, 1985, 73-83.

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Modrow, S., Fan, J. and Zeng, Y.: Selection and production by gentechnological methods of medically

relevant EBV-related antigens. *J. Cancer Res. and Clinical Oncology* (1985).

Motz, M., Fan, J., Zeng, Y. and Wolf, H.: Expression of the EBV early protein p138 in *E.coli* for use as antigen in diagnostic tests. Abstracts of papers presented at the 1985 meeting on Modern Approaches to Vaccines, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985, 63.

Motz, M., Jilg, W., Fan, J. and Wolf, H.: Expression of the membrane protein gp250/350 of EBV for the use as diagnostic antigen and possible vaccine. Abstracts of papers presented at the 1985 meeting on Modern Approaches to Vaccines, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985, 89.

Motz, M., Fan, J., Jilg, W. and Wolf, H.: Expression of Epstein-Barr virus encoded proteins. In Brown, F., Chanock, R.M. and Lerner, R.A. (eds) *Vaccines 86. New approaches to immunization*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986

Wolf, H., Jameson, B., Modrow, S. und Motz, M.: Möglichkeiten und Grenzen der Kontrolle von LAV/HTLV-III assoziierten Erkrankungen. *AIDS-Forschung* 5/1 (1986) im Druck.

Wolf, H., Motz, M., Modrow, S., Jilg, W., Seibl, R., Kühbeck, R., Fan, J. and Zeng, Y.: Epstein-Barr virus and Nasopharyngeal carcinoma. In: K. Munk (ed), *Contr. Oncol.*, 24, Karger, Basel, 1986, im Druck.

Wolf, H., Modrow, S., Motz, M., Seibl, R., Ebbers, J. and Zeng, Y.: Epstein-Barr virus-related diseases and their control. *Proceedings of the Ninth Intern. Congress of infectious and parasitic diseases*, (1986), im Druck.

Motz, M., Fan, J., Jilg, W. and Wolf, H.: Expression of the Epstein-Barr virus 138-kDa early protein in *Escherichia coli* for the use as antigen in diagnostic tests. *Gene* (1986) im Druck.

Motz, M., Deby, G., Jilg, W. and Wolf, H.: Expression of the Epstein-Barr virus major membrane proteins in Chinese hamster ovary cells. *Gene* (1986) im Druck.

Danksagung

Herrn Prof.Dr. Hans Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, die finanzielle Unterstützung und besonders für die praktische und theoretische Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof.Dr. Horst Schmieger danke ich für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie und für reges Interesse.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Deinhardt danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Wolfgang Jilg danke ich für die Durchführung der Immunisierungsexperimente bei Kaninchen.

Frau Gabriele Deby danke ich für ihre engagierte Mitarbeit bei den Transfektionsexperimenten.

Herrn Dr. Ronald Merz danke ich für die Synthese des Oligonukleotids, Herrn Dr. Peter Heinrich für die Durchführung der Sequenzanalysen.

Frau Helga Schmidt danke ich für fotografische Arbeiten bei der Anfertigung der Abbildungen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Virologie am Max von Pettenkofer-Institut danke ich für die gute Zusammenarbeit, sowie für viele nützliche Anregungen und Diskussionen. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Michael Bröker für seine Anregungen bei den ersten Klonierungsexperimenten, das Überlassen von Vektoren und die vielen nützlichen Gespräche danken.

Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (BMFT 01 ZR 8506) angefertigt.

Lebenslauf

Am 3. Februar 1956 wurde ich als Erstes von drei Kindern von Erich Motz und Maria Motz, geb. Kresser, in Lindau am Bodensee geboren.

Vom September 1962 bis Juli 1966 besuchte ich die Volksschule in Lindau-Reutin und trat im September 1966 in das Bodensee-Gymnasium Lindau über. Nach sieben Jahren im humanistischen Zweig der Schule belegte ich während der letzten zwei Jahre der Kollegstufe die Hauptfächer Mathematik und Biologie. Die Reifeprüfung legte ich im Juli 1975 ab und begann im Wintersemester 1975/76 an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Diplombiologie.

Im Herbst 1977 bestand ich die Diplomvorprüfung und im Frühjahr 1980 die Diplomhauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik und Biochemie.

Bis Dezember 1981 fertigte ich unter Anleitung von Prof.Dr. Fiedler am Mikrobiologischen Institut der Universität München meine Diplomarbeit über die Biosynthese von Mannit-Teichonsäuren bei coryneformen Bakterien an. Im Februar 1982 erhielt ich das Diplom im Fach Biologie.

Seitdem arbeite ich am Max von Pettenkofer-Institut in der Arbeitsgruppe Molekulare Virologie von Prof.Dr. Hans Wolf an der gentechnologischen Herstellung von Proteinen des Epstein-Barr Virus.

